

ISSN 0320-9725

Том 88, Номер 4

Апрель 2023



БИОХИМИЯ

www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 88, № 4, 2023

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

Часть II

Редактор выпуска – Н.В. Гуляева

- Эпигенетические механизмы воздействия пренатальной гипергомоцистеинемии на функциональное состояние плаценты и пластичность нервной системы потомства (обзор)
А.В. Арутюнян, Ю.П. Милютин, А.Д. Щербицкая, Г.О. Керкешко, И.В. Залозная 531
- Нейрональные экзосомы как новая система сигналинга (обзор)
А.А. Яковлев 558
- Система метаболизма CoA и ацетил-CoA головного мозга в механизмах нейродегенерации (обзор)
А.Г. Мойсеёнок, Н.П. Канунникова 569
- Нейровоспаление в патогенезе аудиогенной эпилепсии: изменённые уровни провоспалительных цитокинов у предрасположенных к ней крыс линии Крушинского–Молодкиной
Н.М. Сурина, И.Б. Федотова, Г.М. Николаев, В.В. Греченко, Л.В. Ганковская, А.Д. Огурцова, И.И. Полетаева 588
- Патогенетические механизмы психических расстройств: эндогенная интоксикация (обзор)
М.Г. Узбеков 600
- Молекулярные механизмы, опосредующие участие астроцитов в синаптогенезе и пластичности синапсов головного мозга (обзор)
Л.Г. Хаспеков, Л.Е. Фрумкина 614
- Активация транскрипции эмбриональных генов в нейральных предшественниках, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток пациентов с болезнью Паркинсона
В.Б. Федосеева, Е.В. Новосадова, В.В. Ненашева, Л.В. Новосадова, И.А. Гривенников, В.З. Тарантул 629
- Острый и хронический липополисахаридный стресс регион-специфично изменяет экспрессию генов провоспалительных цитокинов в мозге крыс и влияет на обучение и память в водном лабиринте Морриса
М.И. Зайченко, П. Филенко, В. Сидорина, Г.А. Григорьян 642
- Сравнительное исследование экспрессии генов глутаматергической и ГАМКергической систем в гиппокампе крысы после окклюзии средней мозговой артерии и центрального введения липополисахарида
Т.С. Калинина, Г.Т. Шишкина, Д.А. Ланшаков, Е.В. Сухарева, М.В. Онуфриев, Ю.В. Моисеева, Н.В. Гуляева, Н.Н. Дыгало 656
- Миелолигодендроцитарный гликопротеин – аутоантиген при воспалительных демиелинизирующих заболеваниях ЦНС (обзор)
Д.Д. Елисеева, М.Н. Захарова 671

CONTENTS

Vol. 88, Issue 4, 2023

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

Part II

Guest editor N. V. Gulyaeva

Epigenetic Mechanisms of the Maternal Hyperhomocysteinemia Influence on the Placenta Functional State and the Offspring Nervous System Plasticity (Review) <i>A. V. Arutjunyan, Yu. P. Milyutina, A. D. Shcherbitskaia, G. O. Kerkeshko, and I. V. Zalozniaia</i>	531
Neuronal Exosomes as a New Signaling System (Review) <i>A. A. Yakovlev</i>	558
Brain CoA and Acetyl CoA System in Mechanisms of Neurodegeneration (Review) <i>A. G. Moiseenok and N. P. Kanunnikova</i>	569
Neuroinflammation in the Pathogenesis of the Audiogenic Epilepsy: Altered Proinflammatory Cytokine Levels in Krushinsky–Molodkina Seizure-Prone Rats <i>N. M. Surina, I. B. Fedotova, G. M. Nikolaev, V. V. Grechenko, L. V. Gankovskaya, A. D. Ogurtsova, and I. I. Poletaeva</i>	588
Pathogenetic Mechanisms of Mental Disorders: Endogenous Intoxication (Review) <i>M. G. Uzbekov</i>	600
Molecular Mechanisms of Astrocyte Involvement in Synaptogenesis and Brain Synaptic Plasticity (Review) <i>L. G. Khaspekov and L. E. Frumkina</i>	614
Activation of Embryonic Gene Transcription in Neural Precursor Cells Derived from Induced Pluripotent Stem Cells of Patients with Parkinson’s Disease <i>V. B. Fedoseyeva, E. V. Novosadova, V. V. Nenasheva, L. V. Novosadova, I. A. Grivennikov, and V. Z. Tarantul</i>	629
Acute and Chronic Lipopolysaccharide-Induced Stress Changes Expression of Proinflammatory Cytokine Genes in the Rat Brain Region-Specifically and Affects Learning and Memory <i>M. I. Zaichenko, P. Philenko, V. Sidorina, and G. A. Grigoryan</i>	642
Comparative Investigation of Glutamate and GABA Gene Expression in the Hippocampus After Focal Brain Ischemia and Central LPS Administration <i>T. S. Kalinina, G. T. Shishkina, D. A. Lanshakov, E. V. Sukhareva, M. V. Onufriev, Y. V. Moiseeva, N. V. Gulyaeva, and N. N. Dygalo</i>	656
Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein – Autoantigen in Inflammatory Demyelinating Diseases of the Central Nervous System (Review) <i>D. D. Eliseeva and M. N. Zakharova</i>	671

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЛАЦЕНТЫ И ПЛАСТИЧНОСТЬ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПОТОМСТВА

Обзор

© 2023 А.В. Арутюнян^{1,4*}, Ю.П. Милютин^{1,2}, А.Д. Щербицкая^{1,3},
Г.О. Керкешко^{1,4}, И.В. Залозня¹

¹ ФГБУ НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта,
199034 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: alexarutiunjan@gmail.com

² ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет
Минздрава России, 194100 Санкт-Петербург, Россия

³ ФГБУН Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
194223 Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии, 197110 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 23.11.2022

После доработки 02.02.2023

Принята к публикации 02.02.2023

Согласно современным представлениям, предрасположенность к некоторым заболеваниям, в особенности к когнитивным и психоневрологическим нарушениям, может закладываться в период эмбрионального развития. Неблагоприятные воздействия на мать во время беременности служат фактором риска развития патологии в постнатальном периоде. Несмотря на обнаруженную связь между повышенным уровнем аминокислоты гомоцистеин (ГЦ) в крови матери и нарушениями формирования мозга плода, а также когнитивным дефицитом у потомства, роль пластичности мозга в развитии этих патологий остается до сих пор мало исследованной. Настоящий обзор позволяет ознакомиться с имеющимися данными в отношении негативных эффектов гипергомоцистеинемии (ГГЦ) на процессы, обеспечивающие нейрональную пластичность. Важным аспектом рассматриваемой в обзоре проблемы является возможность влияния материнской ГГЦ на пластичность мозга потомства через эпигенетические механизмы. Приведены данные об изменении под воздействием ГГЦ потенциала внутриклеточного метилирования, активности ДНК-метилтрансфераз, степени метилирования ДНК в клетках головного мозга, а также рассмотрено возможное влияние ГГЦ на модификации гистонов и экспрессию микроРНК. Поскольку плацента играет ключевую роль в транспорте питательных веществ и модуляции сигналов, поступающих от матери к плоду, нарушение ее функционального состояния, обусловленное эпигенетическими механизмами, может негативно отражаться на развитии ЦНС плода. В связи с этим в обзоре представлены данные о воздействии материнской ГГЦ на процессы эпигенетической регуляции в плаценте. Приведенные сведения имеют не только теоретическую значимость, но также представляют интерес для понимания роли эпигенетических механизмов в патогенезе заболеваний, фактором риска которых является ГГЦ: патологий беременности, сопровождающихся задержкой развития мозга плода, когнитивных нарушений в детском возрасте и развивающихся позднее психоневрологических и нейродегенеративных заболеваний, а также для поиска подходов к их профилактике с использованием нейротропных препаратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пренатальная (материнская) гипергомоцистеинемия, эпигенетическая регуляция, плод, новорожденный, мозг, плацента, пластичность нервной системы.

DOI: 10.31857/S0320972523040012, EDN: AJXFKF

Принятые сокращения: БА – болезнь Альцгеймера; ГЦ – гомоцистеин; ГГЦ – гипергомоцистеинемия; ДНТ – дефекты нервной трубки; ЗВУР – задержка внутриутробного развития плода; НДЗ – нейродегенеративные заболевания; ПЭ – преэклампсия; BDNF – нейротрофический фактор мозга; DNMT – ДНК-метилтрансфераза; HDAC – деацетилаза гистонов; LINE-1 – длинный диспергированный ДНК-повтор 1; LTP – долговременная потенциация; MeCP2 – метил-CpG-связывающий белок 2; NMDA – N-метил-D-аспаратат; SAH – S-аденозилгомоцистеин; SAM – S-аденозилметионин.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Повышение в крови матери уровня непротеиногенной серосодержащей аминокислоты гомоцистеин (ГЦ) во время беременности, получившее в современной литературе название материнской или пренатальной гипергомоцистеинемии (ГГЦ), может приводить к изменению структуры и функции различных клеток, тканей, органов и систем, вызывая нарушение гомеостаза организма плода в период эмбриогенеза, а также стойкие негативные последствия для различных систем на постнатальном этапе развития [1–4]. К настоящему времени собрано значительное количество экспериментальных доказательств, показывающих, что материнская ГГЦ способна нарушать развитие мозга плода и новорожденного [5–23] и, как следствие этого, нейropsychическое созревание и когнитивные функции потомства [5, 6, 10, 12, 15, 18, 20, 24–38]. Значительное количество клинических данных свидетельствует о том, что повышенный уровень ГЦ в крови матери может быть связан с риском возникновения врожденных патологий развития ЦНС у плода [39, 40]. Появились клинические исследования, в которых установлена взаимосвязь между повышенным содержанием ГЦ в крови матерей и снижением когнитивных функций и умственных способностей у их детей [41–44].

В связи с тем, что ГЦ и его метаболиты обладают выраженными нейротоксическими свойствами, в многочисленных исследованиях описан характер их воздействия на нервную систему в целом и отдельные нервные клетки в частности [45, 46]. На клеточном уровне снижение когнитивных способностей потомства под воздействием материнской ГГЦ связывают с уменьшением специфических субпопуляций нейронов головного мозга за счет активации апоптоза и задержки процесса миграции нейронов, нарушения синтеза нейромедиаторов и формирования синапсов, а также развития нейровоспаления вследствие усиленной активации астроцитов и микроглии [4]. Вместе с тем молекулярные механизмы, лежащие в основе этих функциональных изменений, остаются недостаточно исследованными. К числу наиболее изученных механизмов нейротоксического действия ГЦ относят развитие под влиянием этого соединения состояния окислительного стресса [47–49], эксайтотоксический эффект, обусловленный структурным сходством с глутаматом и осуществляемый через активацию рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA) и метаботропных рецепторов глутамата [45, 50, 51], а также N-гомоцистеинилирование бел-

ков, приводящее к нарушению их структуры и функций [52, 53]. Несмотря на установленное наличие у ГЦ потенциала для воздействия на эпигенетические механизмы, роль этих механизмов в реализации нейротоксических и прочих негативных эффектов ГГЦ на развивающийся мозг остается мало изученной.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ, ИНИЦИИРУЕМЫЕ ГГЦ

ГЦ образуется в организме путем деметилирования незаменимой аминокислоты, метионина, поступающей в организм в составе белков пищи, поэтому обмен ГЦ неразрывно связан с биохимическим циклом превращения метионина и взаимосвязанным с ним фолатным циклом [54]. В ходе метионинового цикла под действием фермента метионинаденилтрансферазы метионин превращается в S-аденозилметионин (SAM), являющийся универсальным донором метильных групп для метилирования широкого спектра субстратов (ДНК, РНК, гистонов, фосфолипидов, катехоламинов и др.). В результате реакций метилирования, катализируемых метилтрансферазами с различной субстратной специфичностью, SAM превращается в S-аденозилгомоцистеин (SAH), который гидролизует до ГЦ под действием S-аденозилгомоцистеингидролазы. SAH по механизму ингибирования продуктом реакции вызывает снижение активности метилтрансфераз, поэтому внутриклеточное соотношение SAM/SAH рассматривается в качестве показателя потенциальной способности клетки к метилированию [55, 56]. Реакция гидролиза SAH обратима, ее равновесие смещено в обратном направлении [56], поэтому для протекания реакции в сторону образования ГЦ необходимо поддержание его низкого уровня в клетках, которое достигается в большинстве органов и тканей путем реметилирования ГЦ до метионина, а также посредством транспорта ГЦ за пределы клетки [57]. Отмечено, что уровень общего ГЦ в крови коррелирует с содержанием внутриклеточного SAH, поэтому предполагается, что увеличение содержания ГЦ в крови через повышение SAH может приводить к снижению в клетках активности метилтрансфераз и тем самым к ингибированию процессов ДНК-метилирования [56]. Реакция реметилирования гомоцистеина с образованием метионина связывает цикл метионина с фолатным циклом, поскольку источником метильных групп для нее служит активная форма фолиевой кислоты

(витамина В₉) 5-метил-тетрагидрофолат. Катализирует данную реакцию фермент метионин-синтаза, в качестве кофермента использующий витамин В₁₂. В некоторых тканях присутствует также фолат-независимый путь реметилирования ГЦ, в котором в качестве донора метильной группы используется аминокислота бетаин, поступающая с пищей или образующаяся в организме из холина. Удаление избытка ГЦ, находящегося в крови, осуществляется в печени и почках через катаболический путь его транссульфирования до цистеина с участием ферментов цистатионин-β-синтазы и цистатионин-γ-лиазы, использующих в качестве кофактора пиридоксальфосфат (витамин В₆). Причиной возникновения ГГЦ может являться нарушение или дисбаланс метионинового и/или фолатного циклов в результате снижения уровня в крови участвующих в метаболизме метильных групп соединений (фолиевой кислоты, витамина В₁₂ и др.), генетически обусловленных нарушений активности ферментов метаболизма фолатов, в первую очередь метилтетрагидрофолатредуктазы (МТГФР), а также мутаций генов ферментов, осуществляющих транссульфирование ГЦ [58].

В последнее время активно исследуется существенная роль, которую ГГЦ может играть в различных эпигенетических модификациях, в первую очередь связанных с реакциями метилирования ДНК и гистонов [56, 59–62].

ГГЦ и процессы метилирования ДНК. В период эмбрионального развития каждая клетка, ткань и орган приобретают характерные только для них паттерны экспрессии генов, которые, как считается, опосредуются эпигенетическими модификациями, в частности метилированием ДНК [63]. Изменение уровня метилирования ДНК является одним из основных эпигенетических механизмов регуляции активности генов [64], при этом считается, что метилирование приводит к ингибированию, а деметилирование – к активации транскрипции генов [65, 66]. У позвоночных метилирование ДНК вовлечено во многие процессы, связанные с развитием организма, включая регуляцию экспрессии онтогенетических генов, поддержание стабильности генома, инактивацию X-хромосомы и геномный импринтинг [67]. Метилирование ДНК осуществляется семейством ферментов ДНК-метилтрансфераз (DNMT). DNMT1 осуществляет «поддерживающее» метилирование вновь синтезированной цепи ДНК по образцу старой в процессе репликации ДНК, в то время как другие члены семейства DNMT (DNMT3a и DNMT3b) экспрессируются только в пери-

од эмбрионального развития и ответственны за установление паттернов метилирования ДНК *de novo* [62]. ДНК-метилирование осуществляется DNMT путем присоединения метильной группы к остатку цитозина в динуклеотиде CpG. Для оценки общего уровня ДНК-метилирования используют подходы, основанные на определении общего содержания 5-метилцитозина в ДНК (глобальное ДНК-метилирование) или метилирования CpG-богатых последовательностей ДНК, в частности, ретротранспозона LINE-1 (длинный диспергированный ДНК-повтор 1), а для изучения метилирования отдельных генов оценивают степень метилирования CpG в их промоторных участках [68].

Длительное время считалось, что процессы ДНК-метилирования необратимы, и установившиеся *de novo* в период эмбрионального развития паттерны метилирования отдельных генов сохраняются на протяжении всей жизни. Крупным прорывом в понимании процессов эпигенетической регуляции стало открытие возможности деметилирования ДНК и, следовательно, обратимости характера метилирования. Деметилирование ДНК осуществляется при помощи семейства белков ТЕТ (транслокационные метилцитозин диоксигеназы), которые способны превращать 5-метилцитозин в 5-гидроксиметилцитозин [69, 70]. 5-Гидроксиметилцитозин сразу же привлек внимание нейробиологов, поскольку было показано, что эта эпигенетическая метка необычайно распространена в ЦНС по сравнению с другими органами [71] и содержится преимущественно в дифференцированных постмитотических нейронах, что согласуется с отмечаемым быстрым повышением уровня 5-гидроксиметилцитозина в период синаптогенеза и созревания нейронов в постнатальном мозге [72, 73].

Функциональные последствия снижения способности клеток к метилированию в результате повышения уровня SAH значительны и могут включать демиелинизацию ЦНС [74], снижение синтеза нейромедиаторов и изменение состава фосфолипидов мембраны [75], нарушение экспрессии генов и дифференциации клеток [56, 62]. Поскольку ГГЦ приводит к повышению внутриклеточного уровня SAH, являющегося ингибитором активности DNMT, закономерно предположить, что общим следствием ГГЦ является снижение ДНК-метилирования в клетках, приводящее к увеличению экспрессии специфических генов. Действительно, в исследовании *in vitro* на нейрональных стволовых клетках было показано, что воздействие ГЦ приводит к повышению внутри-

клеточного содержания SAH и снижению соотношения SAM/SAH (потенциала метилирования), сопровождающемуся снижением активности и экспрессии белков DNMT1, DNMT3a и DNMT3b и гипометилированием ДНК [61]. Вместе с тем в ряде исследований под воздействием ГЦ и/или дефицита фолатов не наблюдалось снижения общего уровня ДНК-метилирования, а иногда отмечалось даже его повышение, сопровождавшееся увеличением степени метилирования отдельных генов и экспрессии отдельных DNMT на уровне мРНК и белка [62, 76, 77]. Скорее всего, характер влияния ГЦ на уровень метилирования ДНК и экспрессии генов зависит от гораздо большей совокупности факторов, таких как тип клеток, внутриклеточные уровни SAH и SAM, отношение SAM/SAH, уровни других компонентов метионинового и фолатного циклов, активность ферментов, вовлеченных в эти циклы, уровень белка и активность DNMT и др. Поэтому столь различными оказываются данные, полученные *in vitro* и *in vivo* в разных экспериментальных моделях ГЦ (введение метионина или ГЦ, диета с дефицитом фолатов, витамина В₁₂ и других доноров метильных групп, животные с мутациями генов ферментов метаболизма ГЦ) [62, 78, 79].

Значительное число исследований посвящено изучению воздействия ГЦ на процессы метилирования в мозге взрослых животных, как модели нейродегенеративных нарушений во взрослом и старческом возрасте. Полученные данные свидетельствуют об изменениях под влиянием хронической ГЦ содержания ДНК-метилтрансфераз, общего метилирования ДНК, метилирования CpG-богатых регуляторных областей и промоторов отдельных генов в мозге, что, по мнению авторов, может приводить к нейродегенеративным нарушениям [80–83]. Предполагается, что через влияние на степень метилирования ДНК и гистонов, а также на экспрессию микроРНК ГЦ может вызывать дисфункцию гематоэнцефалического барьера [82].

Метилирование ДНК имеет решающее значение для развития мозга плода и для выживания нейронов в постнатальный период. Мыши с мозгом, состоящим на 95% из гипометилированных клеток (в результате условного нокаута гена *DNMT1*), умирали при рождении [84]. Животные с более низким содержанием гипометилированных клеток в мозге (30%) выживали, однако гипометилированные клетки претерпевали интенсивную клеточную гибель в течение первых трех недель постнатальной жизни [84]. Показано, что в развивающемся

мозге мыши снижение экспрессии DNMT1 в клетках-предшественниках негативно влияет на созревание и выживание нейронов и вызывает преждевременную астроглиальную дифференцировку [85].

Во время беременности, когда в эпигеноме плода устанавливаются паттерны метилирования ДНК, влияние факторов, которые изменяют биодоступность и/или перенос метильных групп, может привести к необратимым изменениям эпигенома плода. Предполагается, что нарушения развития нервной системы плода, в том числе врожденные дефекты нервной трубки (ДНТ), фактором риска которых является снижение уровня фолатов и повышенное содержание ГЦ в крови матерей, могут быть связаны с эпигенетическими регуляторными механизмами, контролирующими пролиферацию и дифференцировку нейронов [63, 86]. В мозге плодов с ДНТ наблюдалось снижение общего метилирования ДНК, а также снижение метилирования мобильных элементов генома *LINE-1* и повышение содержания их транскриптов, вызывающих хромосомную нестабильность, с которой, как предполагают, связано возникновение ДНТ. Снижение уровня метилирования ДНК в мозге плодов с ДНТ коррелировало с пониженным уровнем фолиевой кислоты и витамина В₁₂ в крови матерей [86].

Влияние пренатальной ГЦ на уровень метилирования ДНК в мозге плодов/новорожденных в экспериментальных моделях изучено недостаточно. В одном из исследований не было отмечено изменений уровня общего метилирования ДНК в мозге новорожденного потомства самок мышей, находившихся во время беременности на диете с недостатком или избытком фолатов, что указывает на наличие гомеостатических механизмов, поддерживающих относительную стабильность уровня ДНК-метилирования в развивающемся мозге [18]. При более выраженном недостатке в пище метильных доноров (фолатов, витамина В₁₂ и холина) у самок крыс развивалась ГЦ, сопровождавшаяся снижением в мозге плодов общего уровня метилирования ДНК, а также отношения SAM/SAH [9]. Недостаток фолатов в пище беременных самок крыс приводил также к снижению в мозге их новорожденного потомства уровня общего метилирования ДНК, общей активности DNMT, экспрессии на уровне мРНК и белка метилтрансфераз DNMT1, DNMT3a и DNMT3b [87].

Недавно проведенный полногеномный анализ метилирования промоторов генов в мозге новорожденных мышей, матери которых находились на диете с недостатком и избытком

фолатов, показал, что влияние этого метильного донора на уровень метилирования в мозге не однонаправленно и зависит от конкретного участка ДНК. Как в группе с недостатком фолатов, так и в группе с их избытком, часть промоторов генов оказалась гипометилированной, а часть – гиперметилированной, хотя при недостатке фолатов количество гипометилированных участков ДНК преобладало над числом гиперметилированных [88]. В этом же исследовании было показано, что недостаток фолатов в крови матери влияет на метилирование в мозге плода широкого ряда генов, участвующих в процессах развития нервной системы, а также в процессах нейрональной пластичности и обучения/памяти, в том числе связанных с сигнальными путями нейротрофинов [88].

В наших предыдущих работах было показано, что при ГГЦ происходит увеличение уровней предшественников нейротрофического фактора мозга *BDNF* и фактора роста нервов *NGF* в плаценте и мозге плодов [11]. *BDNF* критически важен для нейрогенеза и выживания нервных клеток, он также участвует в процессах синаптогенеза, синаптической пластичности и консолидации памяти. Отмечено, что ряд неврологических расстройств связан с нарушением эпигенетической регуляции активности его гена [89, 90]. Повышенное метилирование в промоторной области гена *BDNF* вызывает репрессию его транскрипции в результате рекрутирования метил-СрG-связывающего белка 2 (*MeCP2*, methylated-DNA binding protein 2), способствующего переходу хроматина в компактное неактивное состояние. Диссоциация *MeCP2* от промотора гена *BDNF* вследствие снижения метилирования ДНК приводит к ремоделированию хроматина в активное состояние и активации гена *BDNF* [91, 92], что в дальнейшем может вносить свой вклад в процессы нейрональной пластичности [93]. Влияние ГГЦ на эпигенетическую регуляцию активности генов нейротрофинов, в частности, *BDNF* и *NGF*, пока остается малоизученным, хотя подобные гипотезы были высказаны ранее [94, 95]. Отмечено, что при различных стимулах окружающей среды экспрессия гена *BDNF* может регулироваться эпигенетическими механизмами, такими как метилирование ДНК, модификации гистонов, процессы, протекающие при участии микроРНК [89, 96]. Возможность функционирования подобных механизмов при ГГЦ подтверждается данными о том, что однократное введение взрослым самцам крыс метионина способно приводить к повышению уровня метилирова-

ния и снижению экспрессии гена *BDNF* в гиппокампе [97]. Показано, что материнская диета с дефицитом доноров метильных групп (фолиевой кислоты, витаминов B_{12} и B_6) у мышей приводит к снижению уровня *BDNF* в гиппокампе взрослого потомства [98]. С другой стороны, добавление в пищу беременных самок мышей фолиевой кислоты предотвращало повышение уровня метилирования и снижение экспрессии гена *BDNF* в гиппокампе потомства, вызванное материнской диетой с высоким содержанием жиров [99].

Приведенные данные указывают на жизненно важную роль процессов ДНК-метилирования в программировании нормального развития нервной системы в раннем онтогенезе и свидетельствуют о том, что материнская ГГЦ через нарушение ДНК-метилирования способна оказывать негативное влияние на развитие мозга плода.

ГГЦ и посттрансляционные модификации гистонов. Метилирование гистонов изменяет структуру хроматина, что определяет доступ транскрипционных факторов к регуляторным сайтам ДНК и, следовательно, оказывает влияние на экспрессию генов [100]. Изучению моно- (*me*), ди- (*me2*) и триметилирования (*me3*) α -коровых гистонов H3 и H4 по остаткам лизина (K) придается в настоящее время важное значение, так как считается, что некоторые виды рака и дефекты развития связаны с нарушением этого процесса [101]. Метилирование лизина гистонов обеспечивает активацию или репрессию транскрипции в зависимости от положения лизина и степени его метилирования. Как правило, метилирование гистона H3 по остаткам лизина в положениях 4, 36 и 79 (H3K4, H3K36 и H3K79) считается маркером активной транскрипции, тогда как метилирование H3K9, H3K27 и H4K20, как полагают, связано с конденсированным и транскрипционно-неактивным состоянием хроматина [101]. Особый интерес представляет регуляция уровня метилирования гистона H3 по лизину в положении 4 (H3K4), нарушение которого на уровне ЦНС ассоциируется с различными неврологическими заболеваниями, в том числе с когнитивными нарушениями [102]. Метилирование H3K4 связано с повышенной активностью транскрипции генов, связанных с нейрогенезом, а подавление триметилирования H3K4me3, напротив, ингибирует их экспрессию, что указывает на важную роль характера процесса метилирования гистонов для развития и функционирования нейронов в центральной нервной системе [96]. Поскольку SAM является субстратом для

гистон-метилтрансфераз, а SAH – их ингибитором, уровень ГЦ может влиять на метилирование гистонов [62]. Недавние исследования позволяют полагать, что метиониновый цикл является ключевой метаболической сенсорной системой, которая опосредует независимое от рецепторов распознавание сигналов, связанных с метаболизмом, и модулирует SAM/SAH-зависимое метилирование гистонов в физиологических условиях и при развитии различных заболеваний [103, 104].

Ацетилирование и деацетилирование гистонов является другой важной разновидностью эпигенетической регуляции [62]. Степень ацетилирования гистонов находится в обратной связи со степенью метилирования ДНК [105]. Ацетилирование гистонов, осуществляемое ферментами ацетилазами по остаткам лизина, добавляет отрицательный заряд гистонам и характерно для транскрипционно активного, некомпактного хроматина [106], тогда как деацетилирование гистонов при помощи деацетилаз гистонов (HDAC) приводит к конденсации хроматина и инактивации транскрипции генов [107]. Таким образом, ацетилирование нуклеосомных гистонов играет важную роль в переключении между перmissive и репрессивной структурами хроматина.

Модификации гистонов, в первую очередь их метилирование и ацетилирование, играют значительную роль в процессах нейрогенеза и нейрональной пластичности [96]. Путем изменения экспрессии специфических нейрональных генов они способны влиять на процессы дифференциации нейронов, роста аксонов, морфогенез дендритных шипиков. При помощи модификаций гистонов, наряду с другими эпигенетическими механизмами, осуществляется регуляция экспрессии синаптических белков и молекул, участвующих в процессах синаптической пластичности, таких как BDNF [89, 96].

До сих пор нет прямых доказательств участия ГЦ в ацетилировании гистонов, но предполагается, что посредством изменения уровня метилирования ДНК ГЦ может изменять количество HDAC, образующих комплекс с метил-CpG-связывающими белками, в частности, MeCP2, и таким образом влиять на степень ацетилирования гистонов [62]. Еще один механизм нарушения модификации гистонов под влиянием ГЦ может быть связан с N-гомоцистеинилированием остатков лизина молекул гистонов, что препятствует их нормальному ацетилированию/метилированию [53]. Результаты исследований на клеточных куль-

турах показывают, что ГЦ, помимо влияния на процессы ДНК-метилирования, может вызывать изменения экспрессии метилтрансфераз и ацетилтрансфераз, модифицирующих гистоны [108]. В сердечной ткани мышей при воздействии ГЦ, наряду со снижением активности HDAC1, отмечалось повышение степени ацетилирования по лизину 9 гистона H3 (H3K9ac) [109]. Хроническая ГЦ вызывала повышение уровня H3K9ac и ацетилированного по лизину 12 гистона H4 (H4K12ac) в коре мозга крыс, что может быть связано с индуцируемыми ГЦ нейровоспалительными процессами [110]. Индуцированное ГЦ гипометилирование ДНК и гиперацетилирование гистонов, вызывающее несвоевременную активацию транскрипции различных генов, может сделать ткань мозга более чувствительной к различным повреждениям, в частности, вызванным ишемией-реперфузией [110]. Введение метионина приводило к увеличению в мозге мышей уровня метилирования промотора гена *RELN*, сопровождавшемуся снижением экспрессии белка рилин, ответственного за регуляцию миграции нейронов и формирование слоистой структуры коры в развивающемся мозге, а также за модуляцию синаптической пластичности. При этом введение ингибиторов HDAC увеличивало количество ацетилированных гистонов H3 и снижало метилирование гена *RELN* в мозге [111, 112].

Во время беременности состояние плацентарной гипоксии через различные эпигенетические механизмы (ДНК-метилирование, модификации гистонов, экспрессия микроРНК) может вызывать нарушение развития нервной системы плода, негативно влияя на процессы пролиферации и дифференцировки нервных и эндотелиальных клеток [113, 114]. В модели задержки внутриутробного развития плода (ЗВУР), вызванной плацентарной недостаточностью, сопровождавшейся гипоксией, у потомства крыс наблюдалось увеличение уровня ГЦ и SAH, гипометилирование ДНК, снижение экспрессии *DNMT1* и существенное увеличение содержания ацетилированного гистона H3 в печени [115]. Несбалансированное питание матери через зависимые от метаболических сдвигов эпигенетические механизмы также может оказывать негативное влияние на развитие потомства. Как было отмечено выше, материнская диета с высоким содержанием жиров вызывала гиперметилирование и снижение активности генов, кодирующих BDNF и субъединицу NR2B рецептора NMDA (*GRIN2B*) в мозге потомства [99]. У потомства самок крыс, получавших во время

беременности пищу с высоким содержанием метионина, наблюдалось повышение уровня ГЦ в сыворотке крови, сопровождавшееся гипометилированием ДНК, снижением уровня триметилированного по лизину 9 гистона H3 (H3K9me3) и увеличением H3K9ac в печени [116].

Таким образом, помимо изменения степени метилирования ДНК, материнская ГЦ может влиять на экспрессию генов, контролирующую развитие мозга плода, через воздействие на механизмы посттрансляционных модификаций гистонов (метилирование, ацетилирование), а также путем непосредственного связывания ГЦ с молекулами гистонов (гомоцистеинилирование).

ГЦ и экспрессия микроРНК. Влияние ГЦ на экспрессию микроРНК мало изучено по сравнению с его воздействием на процессы метилирования ДНК и модификации гистонов. Установлено, что ГЦ вызывает дисфункцию гематоэнцефалического барьера, влияя на метилирование ДНК и гистонов, а также на уровни микроРНК. Показано, что ГЦ индуцирует в эндотелиальных клетках мозга увеличение экспрессии более двадцати микроРНК с наибольшим повышением уровня miR29b, которая вызывает снижение уровня DNMT3b и последующее увеличение активности металлопротеиназы ММР-9, что может привести к нарушению целостности гематоэнцефалического барьера [82]. Материнская ГЦ, вызванная дефицитом метильных доноров в пище самок крыс во время беременности, приводила к нарушениям развития и повышению в мозге плодов уровней микроРНК let-7a и miR-34a, экспрессия которых зависит от степени метилирования ДНК [9]. Считается, что обе эти микроРНК участвуют в различных этапах развития мозга и могут играть определенную роль в возникновении ДНТ. Let-7 оказывает воздействие на регуляторные пути, контролирующие пролиферацию и дифференцировку нервных клеток, тесно связанные с возникновением ДНТ. Гены-мишени, на которые воздействует miR-34a, вовлечены в регуляцию клеточного цикла, апоптоза, дифференцировки и поддержания функций нейронов. Повышение уровня miR-34a в мозге новорожденных крысят, матери которых получали пищу с дефицитом фолатов, сопровождалось усилением апоптоза в коре и гиппокампе [19]. К моменту отнятия от груди у потомства матерей с пищевым дефицитом метильных доноров наблюдалось снижение содержания в мозге miR-34a, а также miR-23, являющейся, помимо регуляции клеточной пролиферации и апоптоза, ключевым фактором миелинизации [10].

Приведенные данные свидетельствуют о возможности влияния материнской ГЦ на процессы эпигенетической регуляции (метилирования ДНК, модификаций гистонов и экспрессии микроРНК) в различных тканях развивающегося плода, в том числе в его мозге. Помимо нарушений эпигенетических механизмов в ЦНС плода, материнская ГЦ может также оказать негативное воздействие на эпигенетическую регуляцию формирования и функционирования плаценты — временного органа, имеющего ключевое значение для нормального развития плода.

Эпигенетические модификации в плаценте при воздействии ГЦ. Предполагается, что исходная причина многих нейроповеденческих расстройств у потомства может заключаться в патологических изменениях в плаценте матери во время внутриутробного развития, в том числе опосредованных эпигенетическими механизмами [117]. Процессы эпигенетической регуляции, связанные с метилированием ДНК, модификацией гистонов и экспрессией микроРНК, играют существенную роль в развитии плаценты, принимая участие в пролиферации клеток трофобласта, миграции, инвазии, апоптозе и ангиогенезе [117]. Отмечено, что выработка плацентой определенных факторов и контроль трансплацентарного транспорта различных соединений служат одним из механизмов регуляции развития мозга плода [118]. Наличие тесной связи между плацентой и мозгом плода позволило исследователям сделать вывод о существовании регуляторной оси «плацента → мозг плода» [118–120]. Изучение взаимодействия плаценты и мозга плода на пренатальном этапе развития может открыть новые возможности для ранней диагностики и лечения нейроповеденческих расстройств постнатального периода [118]. Вместе с тем роль в этом взаимодействии эпигенетических механизмов, проявляющихся в физиологических условиях в изменении экспрессии в плаценте специфических генов в ответ на изменяющиеся потребности плода, а также возможные нарушения эпигенетической регуляции в плаценте под влиянием неблагоприятных пренатальных факторов и их последствия для морфологического и функционального развития мозга плода, пока еще слабо изучены [117].

Изменение пула доноров метильных групп во время беременности может привести к нарушению эпигенетической модификации макромолекул в плаценте. Установлено, что избыток ГЦ и недостаток фолатов и других метильных доноров оказывает действие на экспрессию генов плаценты и плода

за счет изменения профиля метилирования ДНК [63, 86, 121].

Недостаток фолатов в пище матерей вызвал нарушение происходящего до формирования плаценты процесса децидуализации стромальных клеток эндометрия матки, играющего важнейшую роль для выживания эмбриона на ранних стадиях имплантации [122]. Нарушение децидуализации материнского эндометрия под влиянием дефицита фолатов сопровождалось множественным изменением профилей метилирования генов, в том числе участвующих в процессе децидуальной трансформации [122].

Влияние соотношения уровней в крови фолиевой кислоты и ГЦ на степень общего ДНК-метилирования в плаценте было изучено в экспериментах на беременных самках крыс [123]. Потребление с пищей совместно ГЦ и фолиевой кислоты, несмотря на повышение уровня ГЦ в крови, не влияло на основные показатели одноуглеродного метаболизма (SAM, SAH и отношение SAM/SAH) в печени матерей и плаценте, при этом уровень общего ДНК-метилирования в плаценте животных этой группы был достоверно выше по сравнению с животными, принимающими исключительно фолиевую кислоту [123]. Вместе с тем диета с дефицитом фолиевой кислоты и высоким содержанием ГЦ вызывала снижение потенциала метилирования, что выражалось в повышении уровня SAH в печени матерей, снижении содержания SAM в плаценте, а также снижении отношения SAM/SAH в обоих этих органах с одновременным снижением степени общего ДНК-метилирования в плаценте. Уровень общего ДНК-метилирования в плаценте имел положительную корреляцию с содержанием фолатов в крови и плаценте и обратную корреляцию с уровнем ГЦ в крови [123]. У женщин с генетически обусловленным снижением активности фермента биосинтеза фолатов МТГФР была отмечена сходная негативная ассоциация уровня метилирования ДНК в плаценте с содержанием ГЦ в крови и положительная корреляция этого показателя с уровнем в крови фолатов [124]. Вместе с тем степень ДНК-метилирования в плаценте может определяться не только уровнем фолатов и ГЦ, но и содержанием в крови витамина В₁₂, поскольку отмечено, что избыток фолатов при одновременно пониженном содержании витамина В₁₂ также вызывает снижение уровня общего ДНК-метилирования в плаценте крыс [125]. Таким образом, характер влияния ГЦ на ДНК-метилирование в плаценте может различаться в зависимости от степени доступности фолатов и витамина В₁₂.

Повышение уровня ГЦ при достаточном содержании этих микронутриентов в крови может приводить к интенсификации процессов метилирования, возможно, за счет повышения содержания в крови метионина, являющегося источником метильных групп. С другой стороны, высокое содержание в крови ГЦ на фоне дефицита фолатов и/или витамина В₁₂ вызывает повышение уровня SAH, являющегося ингибитором метилтрансфераз, а также снижение содержания донора метильных групп SAM, что, вероятно, является причиной ингибирования процессов ДНК-метилирования в плаценте.

В модели ЗВУР, вызванной фолат-дефицитной диетой, у самок мышей наблюдалось понижение содержания SAH в крови матери, снижение уровня общего ДНК-метилирования и метилирования ретротранспозонов *LINE-1* в плаценте и мозге плода, а также увеличение уровня кодируемого *LINE-1* белка ORF1p в тканях плода [126]. Авторы предполагают, что дефицит фолатов может через деметилирование и активацию *LINE-1* вызывать усиление процессов ретротранспозиции внутри генома, приводящее к его нестабильности и в конечном итоге к развитию ЗВУР [126].

Поскольку исследования, в которых изучалась бы прямая зависимость между уровнем ГЦ и/или фолатов в крови матери и эпигенетическими изменениями в плаценте, крайне скудны, мы сочли нужным в этом разделе привести также данные, касающиеся эпигенетических изменений в плаценте при преэклампсии (ПЭ) – патологии беременности, как правило, сопровождающейся повышенным уровнем ГЦ в крови матери [127]. При состоянии ПЭ было отмечено снижение уровня общего метилирования ДНК в плаценте [128]. У женщин с более тяжелой ранней формой ПЭ в ткани плаценты наблюдалось снижение содержания SAM и уменьшение уровня метилирования гена плацентарного фактора роста *PIGF*, а также отрицательная корреляция между этими двумя показателями, позволяющая предположить между ними причинно-следственную связь [60]. Следует отметить, что *PIGF*, синтезируемый плацентой, способен достигать мозга плода и действовать в качестве важного регулятора ангиогенеза мозга [129]. При изучении возможной роли эпигенетических механизмов в развитии ПЭ особое внимание уделяется эпигенетической регуляции процесса инвазии клеток вневорсинчатого трофобласта, нарушение которого, как предполагают, является одной из основных причин развития ПЭ. Было установлено, что

прием фолиевой кислоты, уровень которой обычно снижен при ПЭ, увеличивает инвазивный потенциал клеток плацентарного трофобласта [130]. При этом наблюдалось усиление активности генов, способствующих инвазии, и снижение активности генов, препятствующих этому процессу, во многих случаях сдвиги в активности генов сопровождались соответствующими изменениями уровня метилирования CpG их промоторных регионов [130]. В плацентах женщин с ПЭ было отмечено снижение уровня гистонов H3K4me3 и H3K9ac в клетках вневорсинчатого трофобласта, что может являться одной из причин или индикатором нарушения инвазии этих клеток [131]. В эндотелиальных клетках, выделенных из плацент женщин с ПЭ, наблюдалось повышение уровня экспрессии метилированных гистонов H3K9me2 и H3K9me3, предположительно, связанное с развитием гипоксии и окислительного стресса при ПЭ [132].

Среди прочих эпигенетических механизмов материнская ГГЦ может также оказывать воздействие на функции плаценты посредством изменения экспрессии специфических микроРНК. Значительное количество микроРНК, обнаруживаемых в плаценте, экспрессируется из кластера генов, расположенного на хромосоме 19 (C19MC). В плаценте человека экспрессия кластера C19MC обнаруживается уже на пятой неделе беременности [133]. Гиперэкспрессия кластера C19MC приводит к снижению миграции трофобласта, что указывает на потенциальную роль этого кластера микроРНК в качестве ингибитора миграции, уменьшения ремоделирования спиральных артерий и ишемии плаценты при ПЭ [134]. Другой кластер микроРНК, обнаруженный в плаценте, расположен на хромосоме 14 (C14MC) и кодирует несколько видов микроРНК, которые участвуют в регуляции ключевых физиологических процессов, таких как подавление иммунитета, противовоспалительный и антигипоксический ответ [135]. В отличие от C19MC, экспрессия микроРНК кластера C14MC снижается по мере прогрессирования беременности, указывая на то, что регулируемое повышение и/или понижение экспрессии многочисленных микроРНК на протяжении беременности способствует правильному развитию и функционированию плаценты [136, 137].

Наибольшее число исследований уровней микроРНК в плаценте проведено в аспекте изучения патогенеза ПЭ. Во многих исследованиях обнаружено, что активность miR-210, ключевого фактора ответа на гипок-

сию, конститутивно повышена в плаценте и плазме при ПЭ, вследствие чего ее, наряду с miR-155, регулирующей процессы плацентарного ангиогенеза, рассматривают в качестве предикторов развития ПЭ [138, 139]. Это согласуется с представлениями о том, что одной из причин развития ПЭ являются аномалии плацентарного ангиогенеза, приводящие к состоянию гипоксии. Предполагается, что изменение спектра и уровня микроРНК при ПЭ может вызывать снижение пролиферации и инвазии трофобласта, а также нарушения ангиогенеза, наблюдаемые при данной патологии [140–142]. Помимо повышения уровня miR-210 и miR-155, при ПЭ в плаценте наблюдается активация еще более 10 связанных с окислительным стрессом микроРНК, в том числе miR-29b [143]. Отмечено, что повышение уровня miR-29b усиливает процессы апоптоза в культуре клеток трофобласта, снижает их способности к инвазии и ангиогенезу [141]. С другой стороны, снижение уровня miR-29b в клетках трофобласта приводит к значительному повышению экспрессии генов *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, деацетилазы сиртуина (*SIRT1*), сопровождающемуся повышением общего метилирования ДНК и снижением общего ацетилирования белков [144].

Дисрегуляция под влиянием материнской ГГЦ эпигенетических механизмов (ДНК-метилирование, модификации гистонов и экспрессия микроРНК), играющих важную роль в морфологическом и функциональном развитии плаценты, может служить одной из причин неполного формирования ее сосудистого дерева, нарушения транспортных и секреторных функций плаценты, следствием чего могут являться наблюдаемые при ГГЦ задержка роста плода и нарушение развития его ЦНС.

ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДИФИКАЦИИ И ПЛАСТИЧНОСТЬ МОЗГА

Наиболее широко распространенная в настоящее время гипотеза заключается в том, что долговременная память сохраняется в виде стабильных, вызванных обучением изменений в синаптических связях. Эта гипотеза синаптической пластичности памяти подтверждается обширными экспериментальными данными, собранными в ходе более чем 50-летних исследований, начиная с 70-х гг. прошлого столетия. В последнее время становится все более очевидным, что долговременная память сохраняется главным образом в виде эпигенетических и геномных изменений в нервных клетках.

Синаптическая пластичность может опосредовать быстрое, но относительно кратковременное, максимум в несколько часов, запоминание усвоенной информации. Высказываются предположения о том, что новая память сохраняется путем синаптических изменений, пока она оценивается на предмет ее значимости для организма: если ее значимость превышает некоторое пороговое значение, память затем переносится в ядра нейронов для постоянного хранения [145].

Значительное количество проведенных исследований подтвердило, что эпигенетическая регуляция экспрессии генов, связанных с нейрональной пластичностью, играет существенную роль в формировании и консолидации обучения и памяти, а метилирование ДНК и модификации гистонов являются наиболее важными способами подобной нейроэпигенетической регуляции [96, 146]. Эпигенетические механизмы (метилирование ДНК, метилирование и ацетилирование гистонов) вовлечены в регуляцию процессов пролиферации нервных стволовых клеток, дифференцировки и созревания нейронов, роста нейрональных отростков, влияют на плотность дендритных шипиков нейронов, формирование синапсов и синаптическую пластичность [96, 146]. В экспериментальных исследованиях было выявлено, что метилирование ДНК и модификации гистонов в гиппокампе синхронно регулируют транскрипцию генов при формировании и хранении памяти [147, 148]. Исследования, проведенные на животных моделях неврологических расстройств, показали эффективность использования ингибиторов модификаций гистонов для восстановления нарушенной синаптической пластичности [96].

Нарушение регуляции эпигенетических механизмов вовлечено в развитие различных патологических состояний, начиная от стресса и депрессии и заканчивая тяжелыми нейродегенеративными заболеваниями (НДЗ) [149]. Стойкие эпигенетические изменения могут быть вызваны краткосрочными и долгосрочными стрессорными эффектами, что позволяет предположить возможность влияния факторов окружающей среды на пластичность нейронов путем изменения эпигенетической регуляции в головном мозге. Отмечено, что при хроническом стрессе происходит уменьшение длины и разветвления апикальных дендритов, снижение количества и нарушение функций синапсов на шипиках пирамидных нейронов медиальной префронтальной коры, области CA3 гиппокампа, а также нейронов

гранулярных клеток зубчатой извилины [150, 151]. В последние годы представлены доказательства того, что эпигенетические модификации особенно восприимчивы к воздействию стрессоров в период внутриутробного и неонатального развития [152]. В подтверждение этого в экспериментах на беременных самках мыши показано, что пренатальный стресс матери сопровождается повышенной экспрессией *DNMT1* и *DNMT3A* в ГАМКергических интернейронах плодов на эмбриональных стадиях развития, вызывая в дальнейшем подобное шизофреническое поведение у потомства [153]. Также отмечено, что воздействие психического стресса в течение первой недели жизни у новорожденных крыс изменяет статус метилирования ДНК в промоторной области гена глюкокортикоидного рецептора в головном мозге, что приводит к долгосрочному аномальному поведению [154].

Помимо психологического внутриутробного и перинатального стресса, на развитие нервной системы и дальнейшее функционирование мозга путем изменения эпигенетического статуса могут повлиять и неблагоприятные внешние факторы, такие как недостаточное питание матери, воздействие на организм матери и плода токсических веществ окружающей среды, злоупотребление наркотиками и алкоголем и др. [155]. Материнская ГГЦ также может рассматриваться как разновидность метаболического пренатального стресса, оказывающего долгосрочное неблагоприятное влияние на развивающийся плод и, прежде всего, на его нервную систему [4]. В проведенных нами исследованиях было установлено, что экспериментальная материнская ГГЦ вызывает нарушение развития нервной системы плода, что приводит к снижению устойчивости клеток мозга новорожденных к окислительному стрессу, а в последующем — к изменению гипоталамической регуляции репродуктивных циклов [156] и угнетению когнитивной функции у взрослых животных [12, 26]. Достаточно подробно были изучены последствия и нейротоксические эффекты пренатальной ГГЦ, которые у крысят наблюдаются в постнатальном периоде. Установлено, что перенесенная пренатальная ГГЦ вызывает снижение числа NeuN-позитивных нейронов, увеличение GFAP-позитивных астроцитов и Iba1-позитивных микроглиальных клеток, а также повышение уровня фосфорилирования p38 MAPK в теменной коре и гиппокампе потомства крыс в раннем постнатальном развитии. Наряду с этим, в коре детенышей отмечалось увеличение уровня и активности каспазы-3.

Материнская ГГЦ оказывала негативное влияние на нейрогенез и синаптогенез, что выразилось у плодов и новорожденного потомства в замедлении пролиферации и дифференциации нейрональных стволовых клеток гиппокампа, уменьшении количества нейронов коры мозга [157], нарушении миграции нейронов и снижении уровня принимающих участие в этом процессе семафорина 3Е (SEMA3Е) и молекул адгезии нервных клеток NCAM [5, 23], снижении уровня синаптофизина и зрелой формы BDNF [23, 157]. Исследование на ранних сроках постнатального развития структурной и ультраструктурной организации коры и гиппокампа у потомства крыс, перенесшего пренатальную ГГЦ, выявило дегенеративные изменения нейронов: лизис оргanelл в цитоплазме, разрушение митохондрий, накопление лизосом и появление большого количества глиальных клеток [13, 14]. При этом сравнительный анализ изменений в гиппокампе и коре продемонстрировал участие различных механизмов гибели нейрональных клеток, обусловленное особенностями развития данных областей мозга, что в конечном итоге приводит к различиям в их уязвимости для пренатальной ГГЦ. Таким образом, перенесенная пренатальная ГГЦ вызывает развитие нейровоспалительных процессов в коре и гиппокампе у крысят уже на ранних этапах постнатального развития, что может явиться предпосылкой к формированию у них в дальнейшем выраженных когнитивных нарушений, которые мы наблюдали в более поздний период постнатального развития у половозрелого потомства. Установлено, что структуры гиппокампа более уязвимы к действию ГЦ, чем кортикальные структуры [158, 159]. Исследовательское поведение и психомоторные способности, которые в первую очередь связаны с такими областями мозга, как мозжечок и различные области коры, менее восприимчивы к повреждению, вызванному ГЦ, которое оказывает негативное воздействие на пространственное обучение и долгосрочную память, связанные с гиппокампом, кратковременная рабочая память, по-видимому, меньше подвержена повреждению ГЦ [160]. Нами впервые были получены данные о том, что нарушение кратковременной и долгосрочной памяти у потомства крыс, перенесшего пренатальную ГГЦ, сопровождается снижением моноаминергической передачи в гиппокампе [26]. Наряду с этим, показано истощение содержания катехоламинов в надпочечниках и повышение уровня норадреналина и адреналина в крови потомства крыс после перенесенной прена-

тальной ГГЦ, что может быть причиной развития тревожного состояния и увеличения ошибок в процессе обучения [26, 161]. Изменения нейротрансмиттерной передачи в головном мозге, прежде всего, в гиппокампе, могут явиться причиной развития нарушений памяти и обучения, отмечаемых нами при проведении экспериментов в 8-лучевом лабиринте, в тесте распознавания новых объектов [26] и водного теста Морриса [12]. Нами также установлено, что пренатальная ГГЦ может иметь долговременные последствия в постнатальном периоде, приводя не только к когнитивному дефициту, но и к нарушению регуляции репродуктивной функции. Выявлено нарушение гипоталамической регуляции репродуктивных циклов, в частности процессов, связанных с формированием преовуляторного пика гонадотропин-рилизинг гормона у самок крыс, перенесших пренатальную ГГЦ [156]. Показано также, что действие пренатальной ГГЦ на нейромедиаторные системы гипоталамуса, участвующие в регуляции репродуктивной системы самок крыс, обусловлено не повышением уровня ГЦ в крови потомства в ранний постнатальный период, а его нейротоксическим влиянием на формирование ЦНС при внутриутробном развитии плода.

При исследовании влияния ГГЦ на процессы синаптической пластичности у взрослых животных были отмечены изменения долговременной потенциации (LTP), однако направленность этих изменений различалась в зависимости от концентрации ГЦ и длительности его воздействия [162–166]. В модели пренатальной ГГЦ также наблюдалось снижение LTP у потомства [38]. В рамках изучения ГЦ, как фактора риска развития болезни Альцгеймера (БА), было показано, что хроническая ГГЦ у взрослых животных приводит к снижению количества нейронов гиппокампа, уменьшению числа их дендритных отростков, общего числа дендритных шипиков и количества шипиков грибовидной формы [166–169], что также было отмечено в отношении синаптодин-позитивных дендритных шипиков в модели пренатальной ГГЦ [38]. Помимо влияния на морфологию нейрональных отростков, хроническая ГГЦ может оказывать воздействие на синаптическую передачу посредством изменения экспрессии ключевых пре- и постсинаптических белков. У взрослых животных под влиянием ГГЦ в гиппокампе наблюдалось снижение уровней пресинаптических белков синаптофизина, синапсина I, синаптотагмина, MAP-2 (ассоциированный с микротрубочками белок 2) и постсинаптических белков PSD95

(белок постсинаптической плотности 95) и SAP-97 (синапс-ассоциированный белок 97) [166–172], а также субъединиц NR1 и NR2A рецептора NMDA [166, 167]. В модели материнской ГЦ у потомства различного возраста отмечалось снижение экспрессии субъединицы NR1 на уровне мРНК [38] или белка [32]. Одним из вариантов воздействия ГЦ на механизмы нейрональной пластичности является модификация нейрональных белков. В опытах на линии клеток гиппокампа в условиях недостатка фолатов, приводившего к повышению уровня ГЦ, наблюдалось усиление гомоцистеинилирования и агрегации моторных белков микротрубочек динеина и кинезина, необходимых для развития нейронов и формирования синапсов [173]. Кроме того, во многих исследованиях под влиянием ГЦ отмечались гиперфосфорилирование тау-белка и агрегация β -амилоида, являющиеся причиной когнитивных нарушений и НДЗ, связанных со снижением синаптической пластичности [166–169].

Воздействие на организм ГЦ, вызывая нарушения на клеточном уровне, может привести к серьезным клиническим проявлениям. Интересно, что черная субстанция, гиппокамп, кора головного мозга, а также мозжечок, то есть ключевые структуры для патогенеза болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера и фетального алкогольного синдрома, являются предпочтительными местами проявления нейротоксического действия ГЦ в головном мозге [174–176]. Изменение уровня ГЦ во время беременности является важным фактором программирования экспрессии ключевых генов, регулирующих активность и пластичность нейронов мозга плода и потомства, при этом повышение содержания его предшественника метионина в крови матери связано с развитием у потомства поведенческого фенотипа, характерного для шизофрении и других основных психоневрологических заболеваний [20, 177]. Во многих исследованиях повышенный уровень ГЦ во взрослом возрасте рассматривается как потенциальный фактор риска развития БА [178], в отдельных исследованиях высказаны предположения о том, что пренатальная ГЦ может способствовать развитию БА у взрослого потомства [179, 180].

На основании анализа имеющихся данных Н.В. Гуляевой была выдвинута концепция о сходстве основных молекулярных механизмов, участвующих в нейропластичности и нейропатологии, и сформулировано положение о том, что изменение нормальной пластичности при нейропатологии не означает

исчезновения способности к пластичности, но свидетельствует об изменении формы пластичности [181, 182]. Это наглядно проявляется в раннем онтогенезе, когда мозг особенно чувствителен к воздействию нейротоксических факторов, и в зависимости от силы и интенсивности этих воздействий благодаря изменению формы нейропластичности могут преимущественно проявляться адаптивные свойства нервной системы либо возникнуть предпосылки для развития в краткосрочной или долгосрочной перспективе нейродегенеративных процессов.

Был достигнут значительный прогресс в том, чтобы соотнести aberrантный эпигенетический контроль, наблюдаемый при НДЗ, с дефектными процессами развития нервной системы, приводящими к порокам развития и нарушениям функций, наблюдаемым при этих заболеваниях. В то время как отдельные эпигенетические модификации далеко не всегда сопровождаются изменением фенотипа, их накопление с течением времени потенциально может привести к этому. Со временем и при непрерывном воздействии отмечается повышение чувствительности к ним систем мозга и увеличивается вероятность того, что последующие эпигенетические изменения сформируют фенотип заболевания. Установлено, что нарушение регуляции эпигенома мозга связано с рядом неврологических дисфункций, а aberrантное метилирование ДНК и модификации гистонов наблюдаются при шизофрении, аутизме, посттравматическом стрессовом расстройстве и БА [183]. В настоящее время сложилось четкое представление о том, что развитие мозга — это процесс, длящийся всю жизнь и чувствительный как к генетическим факторам, так и к факторам окружающей среды. В то время как генетический код инвариантен, эпигенетические изменения, происходящие в критические периоды и обусловленные нарушением процессов метилирования ДНК и модификации гистонов, могут привести к ухудшению пластичности мозга и увеличить риск снижения когнитивных способностей в дальнейшей жизни. Хотя критические периоды преимущественно связаны с ранним развитием мозга, они происходят на протяжении всей жизни: формирование гамет, внутриутробное развитие, половое созревание и репродуктивное старение — все это переходные периоды, которые сверхчувствительны к воздействию неблагоприятных факторов на репродуктивную функцию [183].

Дальнейшему выявлению механистических взаимосвязей между нарушениями эпи-

генетических механизмов и дефектами развития нервной системы должны способствовать инновационные исследования, использующие различные подходы к редактированию эпигенома [184]. Поскольку на изменения эпигеномных показателей могут влиять экологические факторы, будущие исследования должны показать, каким образом негативные экологические воздействия могут приводить к дискретным эпигеномным изменениям и тем самым вносить вклад в патофизиологию НДЗ. Использование отдельных эпигенетических изменений в качестве диагностических инструментов может помочь в ранней и правильной диагностике НДЗ. Ранняя диагностика имеет большое значение, поскольку во время эмбриогенеза и ранней постнатальной жизни развивающийся мозг динамически адаптируется к внешним стимулам [185], что может быть использовано для противодействия определенным нарушениям.

В связи с тем, что в ряде случаев в основе отставания развития нервной системы и/или психических расстройств, включая заболевания, которые проявляются на разных этапах жизни, такие как тяжелые формы депрессии, шизофрения, БА и др., лежит нарушение метилирования в развивающемся мозге из-за унаследованных мутаций и эпигенетических нарушений, перспективным для терапии подобных расстройств видится использование доноров метильных групп. Применение SAM в качестве универсального метильного донора продемонстрировало эффективность в лечении нервно-психических заболеваний на протяжении всей жизни, причем было предложено начать его как можно раньше, что повышает терапевтические эффекты и/или потенциальное предотвращение проявления болезни. Что касается эффективности терапии у лиц с существующими психическими расстройствами, то имеются веские доказательства в поддержку использования SAM при лечении депрессивных расстройств. SAM рекомендуется использовать в качестве варианта терапии второй линии после неадекватного ответа на лечение обычными антидепрессантами [186]. Благодаря благоприятному профилю безопасности SAM может быть особенно подходящим для лечения депрессии у детей, подростков и беременных женщин. Однако необходимы дальнейшие исследования в этом направлении для подтверждения его использования среди этих потенциально уязвимых групп населения. Новые исследования были сосредоточены на функции SAM как потенциального средства при терапии БА, являющейся прогрес-

сирующим и необратимым заболеванием без эффективного лечения. Ряд факторов риска усугубляют БА, включая дефицит фолиевой кислоты и витамина В₁₂. SAM продемонстрировал положительный эффект, предотвращая прогрессирование признаков БА, вызванных дефицитом витаминов группы В. SAM снижал выработку β-амилоида и предотвращал накопление фосфорилированного тау-белка на животных моделях. В то же время клинические проявления БА также были ослаблены с помощью SAM. Недавние клинические испытания эффективности показали, что SAM можно использовать в составе питательной композиции [187] для поддержания или улучшения когнитивных функций и настроения/поведения у пациентов с БА [188]. Несмотря на то что SAM имеет благоприятный профиль безопасности, все же следует иметь в виду, что он может вызывать повышение уровня ГЦ, что связано с риском развития сердечно-сосудистых заболеваний [189].

Вместе с доказательствами того, что эпигенетические модификации являются динамическими и обратимыми, представляется вероятным, что эпигенетически спровоцированных изменений в развитии мозга можно избежать, используя соответствующие ингибиторы этих регуляторных механизмов. На самом деле некоторые из этих ингибирующих молекул уже применяются для фармацевтического лечения, и многие из них находятся в стадии разработки. Например, ингибиторы HDAC трихостатин А и 4-фенилбутират, наряду с 5-аза-дезокситидином, ингибитором метилтрансферазы, широко используются для лечения синдрома ломкой X-хромосомы (fragile X syndrome, синдром Мартина–Белл), наследственного X-сцепленного заболевания, возникающего в результате нарушений в гене *FMR1* (fragile X mental retardation 1), который необходим для нормального развития ЦНС. Другой ингибитор HDAC, вальпроевая кислота, применяется для снижения частоты приступов у пациентов с эпилепсией и синдромом Ретта – наследственным психоневрологическим заболеванием, связанным с мутацией расположенного в X-хромосоме гена, кодирующего белок MeCP2 [153]. Обычно считалось, что терапевтические средства, нацеленные на эпигенетические регуляторы, будет трудно разработать для испытания на людях, а также применять из-за низкой степени специфичности и большого влияния эпигенетической регуляции во время процессов развития. Основное ограничение связано с потенциальным воздействием на нецелевые гены, показанным, например,

для ингибиторов гистоновых метилтрансфераз и HDAC. Применение этих ингибирующих соединений в качестве терапевтического подхода также способствует активации онкогенов и потенциально увеличивает риск развития метастазов [190].

Текущие исследовательские цели лечения НДЗ направлены на то, чтобы использовать в качестве потенциального подхода технологии, позволяющие непосредственно устранить генетическую причину конкретного заболевания, одной из которых является система редактирования генома CRISPR/dCas9. Недавно она была использована в мышинной модели синдрома Драве для восстановления гаплонедостаточности гена *SCN1A*, играющего важную роль в развитии различных форм эпилепсии [191]. В другом исследовании система dCas9–SunTag использовалась для восстановления межполушарной коммуникации путем целенаправленной доставки репрессорного белка C11orf46 к промотору гена *SEMA6A*, кодирующего белок семафорин, что приводило к нормализации роста и ветвления аксонов развивающихся транскаллозальных кортикальных нейронов [192]. Более очевидным видится применение эпигенетического подхода на основе dCas9 для потенциального лечения синдрома ломкой X-хромосомы, связанного с потерей экспрессии белка FMRP вследствие гиперметилирования промотора гена *FMR1* и сопровождающегося умственной отсталостью различной степени тяжести. Использование системы dCas9–TET, нацеленной на деметилирование промотора гена *FMR1*, вызывало почти полное восстановление экспрессии участвующего в формировании синапсов и играющего ключевую роль в поддержании синаптической пластичности белка FMRP у мышей [193]. Несмотря на существование некоторых подходов к терапии НДЗ, профилактика соответствующих расстройств продолжает оставаться первоочередной задачей. Поэтому будущие исследования должны выявить молекулярные сигнальные каскады и их связь с эпигенетическими модификациями в здоровом мозге и при НДЗ. Это также включает анализ пространственно-временной динамики эпигенетических механизмов и паттернов, который поможет выяснить причины и выработать меры профилактики или лечения НДЗ.

Влияние на эпигенетические модификации, такие как метилирование ДНК и модификация гистонов, в сочетании с доступными методами антиоксидантной и нейропротекторной терапии потенциально может благодаря пластичности мозга стимулировать адаптивный ответ организма, что приведет к улучшению кли-

нического проявления нервно-психических заболеваний, предрасположенность к которым закладывается при беременности, в том числе под воздействием таких неблагоприятных факторов, как ГЦ. В этой связи уместно отметить, что в таком аспекте весьма обнадеживающим подходом может быть использование в качестве нейропротектора, обладающего ярко выраженными антиоксидантными свойствами, гормона эпифиза мелатонина, вклад которого в регуляцию эпигенетических модификаций при различных НДЗ был недавно описан [194]. В последнее десятилетие появились сообщения о том, что мелатонин играет важную роль в регуляции нейрогенеза, и, таким образом, он может быть потенциальным средством лечения неврологических и психических расстройств, связанных с нарушением развития нервной системы [195, 196]. Было показано, что мелатонин способствует повышению жизнеспособности, пролиферации и дифференцировки нейронов гиппокампа *in vivo* и нервных стволовых клеток *in vitro* [197–199]. В эксперименте с клетками PC12 установлено, что антагонист рецепторов мелатонина лузиндол может устранять действие мелатонина, что приводит к уменьшению роста нейритов и уменьшению числа зрелых нейронов [200]. В клеточной модели нервных стволовых клеток среднего мозга крыс мелатонин усиливал дофаминергическую дифференцировку нейронов 14-го дня эмбрионального развития, причем эффект достигался путем увеличения образования BDNF и глиального нейротрофического фактора GDNF [201]. Более того, мелатонин способствовал выработке BDNF и GDNF в клетках, продуцирующих провоспалительные цитокины (IL-18), и подавлял индуцированное ими ингибирование пролиферации и дифференцировки нервных стволовых клеток [200].

Нейропротекторные эффекты мелатонина в отношении негативных эффектов ГЦ на ЦНС, основанные на его антиоксидантных, противовоспалительных и антиапоптотических свойствах, достаточно подробно изучены [202]. Некоторые исследователи подчеркивают, что мелатонин способен не только поглощать кислородные радикалы, индуцируемые при ГЦ, но также действовать как гормональный фактор, регулирующий метаболизм низкомолекулярных тиолов [202, 203]. В ряде исследований было показано, что хроническое введение мелатонина животным с ГЦ сопровождается снижением концентрации ГЦ в крови до нормальных значений, а повышение уровня ГЦ, вызванное пинеалэктомией, нивелируется путем введения пинеалэктомированным животным

мелатонина [202]. Помимо непосредственного воздействия на уровень ГЦ, введение мелатонина способствует повышению содержания в тканях глутатиона, в свою очередь, способного снижать концентрацию ГЦ в крови и обладающего протекторным эффектом в отношении нейротоксического действия ГЦ [202, 203].

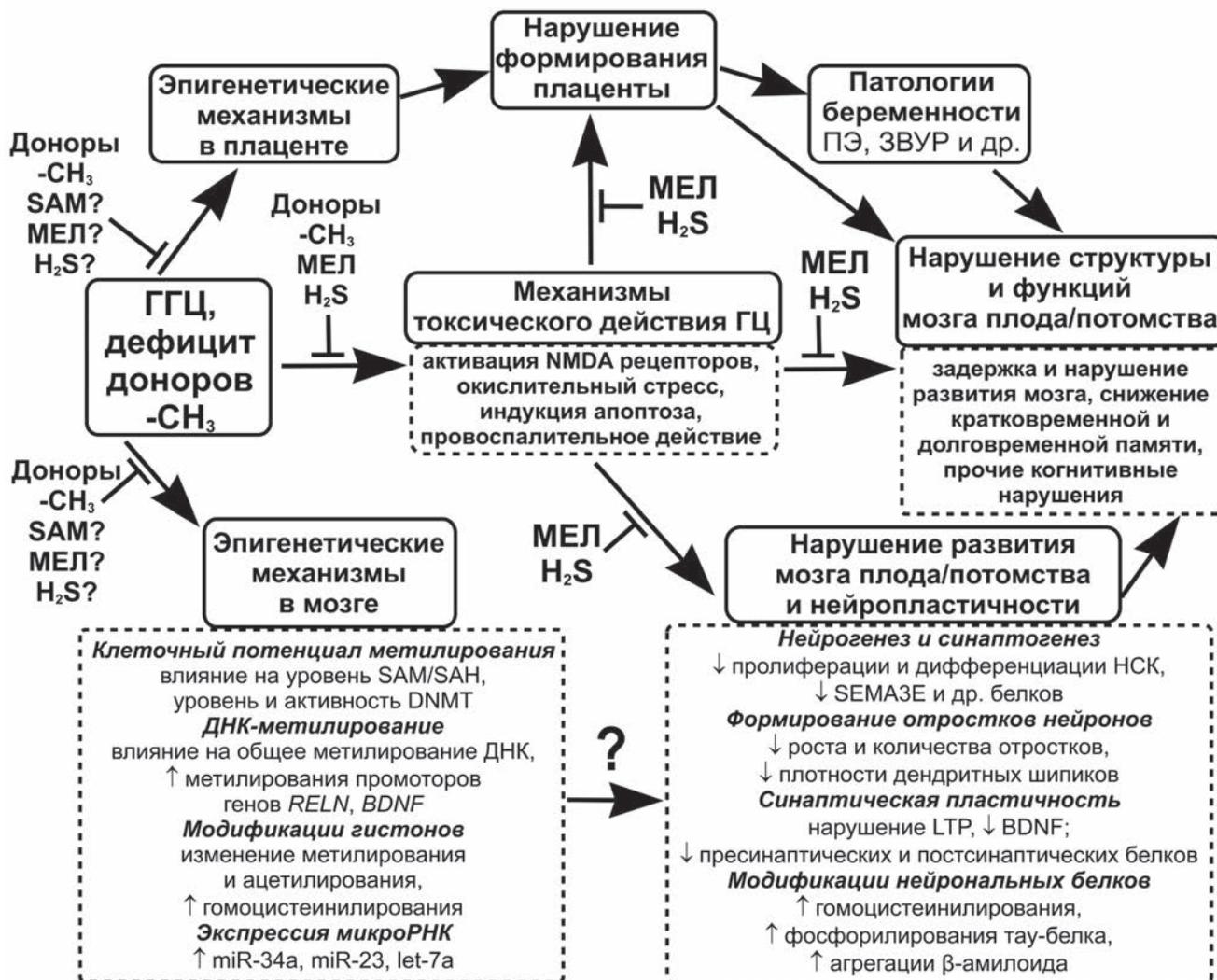
Тем не менее, на наш взгляд, нейропротекция при ГГЦ изучена недостаточно, и настоящее время надо рассматривать как раннюю стадию исследований возможности использования мелатонина в качестве средства, снижающего нейротоксичность ГЦ. В этом аспекте, наряду с мелатонином, представляет также интерес исследование в качестве нейропротектора сероводорода, обладающего антиоксидантным и противовоспалительным действием [204] и способного предотвращать развитие окислительного стресса в мозге, нарушения нейропластичности и когнитивную дисфункцию под влиянием ГГЦ [27, 28, 170], однако при этом необходимо учитывать, что биохимические механизмы нейротоксичности H_2S нуждаются в дальнейшем изучении.

Обобщая изложенное выше, следует предположить, что материнская ГГЦ, помимо достаточно хорошо изученных нейротоксических эффектов, связанных с активацией NMDA-рецепторов, индукцией окислительного стресса и апоптоза и развитием нейровоспалительной реакции, может оказывать негативное влияние на развитие мозга потомства через эпигенетические механизмы, такие как метилирование ДНК, посттрансляционные модификации гистонов и экспрессия микроРНК. Собрано значительное количество данных, свидетельствующих о нарушении процессов нейрональной пластичности под влиянием ГГЦ (изменение LTP, снижение уровня пре- и постсинаптических белков и др.), что может являться одной из причин развития когнитивного дефицита у потомства, подвергнувшегося пренатальной ГГЦ. Представленные в обзоре данные позволяют выдвинуть гипотезу о том, что причиной нарушений пластичности мозга под влиянием ГГЦ, наряду с известными нейротоксическими эффектами ГЦ, может также являться его воздействие на эпигенетические механизмы, контролирующие экспрессию генов, вовлеченных в регуляцию процессов нейропластичности. Нарушение под влиянием материнской ГГЦ формирования плаценты, в частности, ее кровеносной сети, способно оказывать дополнительное негативное влияние на развитие мозга плода, вызывая снижение поступления к плоду кислорода, питательных веществ и соединений, необходимых для

нормального развития его мозга. Негативное влияние материнской ГГЦ на процессы развития мозга плода и нейрональной пластичности может иметь как ранние негативные последствия для потомства в детском возрасте, выражаясь в снижении когнитивных и умственных способностей и расположенности к развитию аутизма, так и более отдаленные эффекты, связанные с предрасположенностью к психоневрологическим заболеваниям в зрелом возрасте и к НДЗ – в пожилом возрасте. В качестве универсальных протекторов против негативных эффектов ГГЦ могут быть использованы в первую очередь доноры метильных групп (фолиевая кислота и витамин B_{12} , бетаин, холин), способные снижать уровень ГЦ через активацию его реметилирования до метионина. В качестве протекторов токсических эффектов ГЦ используются соединения, обладающие антиоксидантными и противовоспалительными свойствами (мелатонин, H_2S и др.). Протекторами в отношении воздействия ГГЦ на эпигенетические механизмы, помимо упомянутых метильных доноров, снижающих уровень ГЦ, могут выступать также SAM, восстанавливающий сниженный под влиянием ГГЦ внутриклеточный потенциал метилирования, а также другие модуляторы эпигенетических процессов. На представленной схеме (рисунок) показано воздействие ГЦ на процессы эпигенетической регуляции и нейрональной пластичности, которые могут быть вовлечены в формирование нарушений развития мозга плода и когнитивного дефицита у потомства при материнской ГГЦ, а также возможный вклад плацентарной составляющей в эти нарушения и предполагаемые механизмы защитного действия нейропротекторов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При всем разнообразии эпигенетических механизмов важнейшими из них являются процессы ДНК-метилирования, посттрансляционные модификации гистонов, а также экспрессия микроРНК. Все эти механизмы вовлечены в регуляцию транскрипции генов, ответственных за развитие мозга, особенно важна их роль в раннем онтогенезе. В последнее время появились доказательства того, что эпигенетические модификации играют существенную роль в регуляции адаптивных процессов нейропластичности. Установлено, что ГЦ, вовлеченный в пути метаболизма одноуглеродных фрагментов, способен влиять на эпигенетические процессы в мозге плода и в плаценте. Мы предполагаем,



Воздействие гипергомоцистеинемии на процессы эпигенетической регуляции и нейрональной пластичности, которые могут участвовать в формировании нарушений развития мозга плода и когнитивного дефицита у потомства при материнской гипергомоцистеинемии. ГГЦ или дефицит метильных доноров, в большинстве случаев приводящий к повышению уровня ГЦ, вызывает изменение в клетках потенциала метилирования (отношения SAM/SAH), активности и экспрессии DNMT, что, в свою очередь, оказывает влияние на степень общего метилирования ДНК и на уровень метилирования промоторов и активность отдельных генов. ГЦ также способен осуществлять влияние на экспрессию генов через воздействие на механизмы, регулирующие посттрансляционные модификации гистонов (метилирование и ацетилирование), путем непосредственного связывания с гистонами (гомоцистеинилирование), а также, возможно, через изменение экспрессии микроРНК. Воздействие материнской ГГЦ на эпигенетические механизмы, контролирующие экспрессию белков, отвечающих за нейрогенез, глиогенез, синаптогенез и синаптическую передачу сигналов, может являться одной из причин нарушений развития мозга плода и новорожденного, а также через снижение нейрональной пластичности оказывать негативное влияние на когнитивные способности потомства. Посредством токсических и эпигенетических механизмов ГЦ может вызывать нарушение формирования плаценты, и, в частности, ее кровеносной сети, что отмечается при таких патологиях беременности, как ПЭ и ЗВУР. Недостаточное кровоснабжение плаценты, в свою очередь, должно приводить к снижению поступления к плоду соединений, необходимых для нормального развития его мозга. Использование в качестве протекторов доноров метильных групп (фолиевая кислота и витамин В₁₂, бетаин, холин), снижающих уровень ГЦ, эффективно на начальных этапах для предотвращения негативных токсических и эпигенетических эффектов ГЦ. При развитии окислительного стресса под влиянием ГЦ в качестве протекторов токсических эффектов ГЦ могут быть использованы соединения, обладающие антиоксидантными и противовоспалительными свойствами, такие как мелатонин, H₂S и др. Протектором в отношении негативных эпигенетических эффектов ГЦ, связанных с ингибированием ДНК-метилирования, может выступать SAM, восстанавливающий сниженный под влиянием ГЦ внутриклеточный потенциал метилирования. Обозначения: ГЦ – гомоцистеин; ГГЦ – гипергомоцистеинемия; Доноры-CH₃ – метильные доноры (соединения, участвующие в процессе метилирования ГЦ с образованием метионина: фолиевая кислота, витамин В₁₂, бетаин, холин); ЗВУР – задержка внутриутробного развития плода; НСК – нейрональные стволовые клетки; MEL – мелатонин; ПЭ – преэклампсия; BDNF – нейротрофический фактор мозга; В₉ – фолиевая кислота; В₁₂ – витамин В₁₂; DNMT – ДНК-метилтрансфераза; LTP – долговременная потенциация; NMDA – N-метил-D-аспартат; *RELN* – ген рилина; SAH – S-аденозил-гомоцистеин; SAM – S-аденозилметионин; SEMA3E – семафорин 3E; ↑ – повышение уровня; ↓ – снижение уровня

что материнская ГГЦ может оказывать негативное воздействие на развитие мозга плода не только посредством изученных нейротоксических эффектов, но и путем воздействия на эпигенетические механизмы, регулирующие процессы нейропластичности, что, возможно, является одной из причин снижения когнитивных способностей потомства под влиянием ГГЦ. Будучи фактором риска когнитивного дефицита в ранние годы жизни, пренатальная ГГЦ может иметь и более отдаленные последствия, такие, как развитие психоневрологических расстройств в зрелом возрасте и, возможно, предрасположенность к НДЗ при старении. Несмотря на достигнутые успехи, многие вопросы, связанные с исследованием молекулярных механизмов негативного влияния ГГЦ на процессы эпигенетической регуляции, его последствий и возможной протекции, требуют дальнейшего исследования. Изучение роли эпигенетических механизмов в регуляции процессов нейрональной пластичности в мозге и их нарушений под влиянием ГЦ представляет

особый интерес в связи с разработкой возможных стратегий воздействия на эпигеном, позволяющих предотвратить или ослабить развитие неврологических патологий, фактором риска развития которых служит ГГЦ.

Вклад авторов. А.В. Арутюнян – исходная концепция; А.В. Арутюнян, Г.О. Керкешко, Ю.П. Милютин, А.Д. Щербицкая, И.В. Залозная – сбор и обсуждение литературных данных; А.В. Арутюнян, Г.О. Керкешко, Ю.П. Милютин, А.Д. Щербицкая, И.В. Залозная – написание текста; А.В. Арутюнян, Г.О. Керкешко – редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00393).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Irvine, N., England-Mason, G., Field, C. J., Dewey, D., and Aghajafari, F. (2022) Prenatal folate and choline levels and brain and cognitive development in children: a critical narrative review, *Nutrients*, **14**, 364, doi: 10.3390/nu14020364.
- Naninck, E. F. G., Stijger, P. C., and Brouwer-Brolsma, E. M. (2019) The importance of maternal folate status for brain development and function of offspring, *Adv. Nutr.*, **10**, 502-519, doi: 10.1093/advances/nmy120.
- Korsmo, H. W., and Jiang, X. (2021) One carbon metabolism and early development: a diet-dependent destiny, *Trends Endocrinol. Metab.*, **32**, 579-593, doi: 10.1016/j.tem.2021.05.011.
- Arutjunyan, A. V., Kerkeshko, G. O., Milyutina, Y. P., Shcherbitskaia, A. D., and Zalozniaia, I. V. (2021) Prenatal stress in maternal hyperhomocysteinemia: impairments in the fetal nervous system development and placental function, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 716-728, doi: 10.1134/S0006297921060092.
- Baydas, G., Koz, S. T., Tuzcu, M., Nedzvetsky, V. S., and Etem, E. (2007) Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by high methionine diet on the learning and memory performance in offspring, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **25**, 133-139, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2007.03.001.
- Baydas, G., Koz, S. T., Tuzcu, M., and Nedzvetsky, V. S. (2008) Melatonin prevents gestational hyperhomocysteinemia-associated alterations in neuro-behavioral developments in rats, *J. Pineal Res.*, **44**, 181-188, doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00506.x.
- Koz, S. T., Gouwy, N. T., Demir, N., Nedzvetsky, V. S., Etem, E., and Baydas, G. (2010) Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by methionine intake on oxidative stress and apoptosis in pup rat brain, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **28**, 325-329, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2010.02.006.
- Pustygina, A. V., Milyutina, Y. P., Zaloznyaya, I. V., and Arutyunyan, A. V. (2015) Indices of oxidative stress in the brain of newborn rats subjected to prenatal hyperhomocysteinemia, *Neurochem. J.*, **9**, 60-65, doi: 10.1134/s1819712415010079.
- Geoffroy, A., Kerek, R., Pourie, G., Helle, D., Gueant, J. L., Daval, J. L., and Bossenmeyer-Pourie, C. (2017) Late maternal folate supplementation rescues from methyl donor deficiency-associated brain defects by restoring Let-7 and miR-34 pathways, *Mol. Neurobiol.*, **54**, 5017-5033, doi: 10.1007/s12035-016-0035-8.
- Geoffroy, A., Saber-Cherif, L., Pourie, G., Helle, D., Umoret, R., Gueant, J. L., Bossenmeyer-Pourie, C., and Daval, J. L. (2019) Developmental impairments in a rat model of methyl donor deficiency: effects of a late maternal supplementation with folic acid, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 973, doi: 10.3390/ijms20040973.
- Arutjunyan, A. V., Milyutina, Y. P., Shcherbitskaia, A. D., Kerkeshko, G. O., Zalozniaia, I. V., and Mikhel, A. V. (2020) Neurotrophins of the fetal brain

- and placenta in prenatal hyperhomocysteinemia, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 248-259, doi: 10.1134/S000629792002008X.
12. Arutjunyan, A., Kozina, L., Stvolinskiy, S., Bulygina, Y., Mashkina, A., and Khavinson, V. (2012) Pinealon protects the rat offspring from prenatal hyperhomocysteinemia, *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **5**, 179-185.
 13. Shcherbitskaia, A. D., Vasilev, D. S., Milyutina, Y. P., Tumanova, N. L., Mikhel, A. V., Zalozniaia, I. V., and Arutjunyan, A. V. (2021) Prenatal hyperhomocysteinemia induces glial activation and alters neuroinflammatory marker expression in infant rat hippocampus, *Cells*, **10**, 1536, doi: 10.3390/cells10061536.
 14. Shcherbitskaia, A. D., Vasilev, D. S., Milyutina, Y. P., Tumanova, N. L., Zalozniaia, I. V., Kerkeshko, G. O., and Arutjunyan, A. V. (2020) Maternal hyperhomocysteinemia induces neuroinflammation and neuronal death in the rat offspring cortex, *Neurotox Res.*, **38**, 408-420, doi: 10.1007/s12640-020-00233-w.
 15. Jadavji, N. M., Deng, L., Malysheva, O., Caudill, M. A., and Rozen, R. (2015) MTHFR deficiency or reduced intake of folate or choline in pregnant mice results in impaired short-term memory and increased apoptosis in the hippocampus of wild-type offspring, *Neuroscience*, **300**, 1-9, doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.04.067.
 16. Saber Cherif, L., Pourie, G., Geoffroy, A., Julien, A., Helle, D., Robert, A., Umoret, R., Gueant, J. L., Bossenmeyer-Pourie, C., and Daval, J. L. (2019) Methyl donor deficiency during gestation and lactation in the rat affects the expression of neuropeptides and related receptors in the hypothalamus, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 5097, doi: 10.3390/ijms20205097.
 17. Schweinberger, B. M., Rodrigues, A. F., Turcatel, E., Pierozan, P., Pettenuzzo, L. F., Grings, M., Scaini, G., Parisi, M. M., Leipnitz, G., Streck, E. L., Barbe-Tuana, F. M., and Wyse, A. T. S. (2018) Maternal hypermethioninemia affects neurons number, neurotrophins levels, energy metabolism, and Na⁺,K⁺-ATPase expression/content in brain of rat offspring, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 980-988, doi: 10.1007/s12035-017-0383-z.
 18. De Crescenzo, A. H., Panoutsopoulos, A. A., Tat, L., Schaaf, Z., Racherla, S., Henderson, L., Leung, K. Y., Greene, N. D. E., Green, R., and Zarbali, K. S. (2020) Deficient or excess folic acid supply during pregnancy alter cortical neurodevelopment in mouse offspring, *Cereb. Cortex*, **31**, 635-649, doi: 10.1093/cercor/bhaa248.
 19. Li, W., Li, Z., Zhou, D., Zhang, X., Yan, J., and Huang, G. (2019) Maternal folic acid deficiency stimulates neural cell apoptosis via miR-34a associated with Bcl-2 in the rat foetal brain, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **72**, 6-12, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2018.11.002.
 20. Chen, S., Alhassen, W., Yoshimura, R., De Silva, A., Abbott, G. W., Baldi, P., and Alachkar, A. (2020) Metabolomic and transcriptomic signatures of prenatal excessive methionine support nature rather than nurture in schizophrenia pathogenesis, *Commun. Biol.*, **3**, 409, doi: 10.1038/s42003-020-01124-8.
 21. Craciunescu, C. N., Johnson, A. R., and Zeisel, S. H. (2010) Dietary choline reverses some, but not all, effects of folate deficiency on neurogenesis and apoptosis in fetal mouse brain, *J. Nutr.*, **140**, 1162-1166, doi: 10.3945/jn.110.122044.
 22. Милютина Ю. П., Щербицкая А. Д., Салтыкова Е. Д., Козина Л. С., Журавин И. А., Наливаева Н. Н., Арутюнян А. В. (2017) Метаболические нарушения в плаценте и мозге плодов беременных крыс при экспериментальной гипергомоцистеинемии, *Росс. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова*, **103**, 1280-1291.
 23. Vasilev, D. S., Shcherbitskaia, A. D., Tumanova, N. L., Mikhel, A. V., Milyutina, Y. P., Kovalenko, A. A., Dubrovskaya, N. M., Inozemtseva, D. B., Zalozniaia, I. V., and Arutjunyan, A. V. (2023) Maternal hyperhomocysteinemia disturbs the mechanisms of embryonic brain development and its maturation in early postnatal ontogenesis, *Cells*, **12**, 189, doi: 10.3390/cells12010189.
 24. Blaise, S. A., Nedelec, E., Schroeder, H., Alberto, J. M., Bossenmeyer-Pourie, C., Gueant, J. L., and Daval, J. L. (2007) Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats, *Am. J. Pathol.*, **170**, 667-679, doi: 10.2353/ajpath.2007.060339.
 25. Blaise, S. A., Nedelec, E., Alberto, J. M., Schroeder, H., Audonnet, S., Bossenmeyer-Pourie, C., Gueant, J. L., and Daval, J. L. (2009) Short hypoxia could attenuate the adverse effects of hyperhomocysteinemia on the developing rat brain by inducing neurogenesis, *Exp. Neurol.*, **216**, 231-238, doi: 10.1016/j.expneurol.2008.11.020.
 26. Shcherbitskaya, A. D., Milyutina, Y. P., Zaloznyaya, I. V., Arutjunyan, A. V., Nalivaeva, N. N., and Zhuravin, I. A. (2017) The effects of prenatal hyperhomocysteinemia on the formation of memory and the contents of biogenic amines in the rat hippocampus, *Neurochem. J.*, **11**, 296-301, doi: 10.1134/s1819712417040080.
 27. Yakovleva, O. V., Ziganshina, A. R., Dmitrieva, S. A., Arslanova, A. N., Yakovlev, A. V., Minibayeva, F. V., Khaertdinov, N. N., Ziyatdinova, G. K., Giniatullin, R. A., and Sitdikova, G. F. (2018) Hydrogen sulfide ameliorates developmental impairments of rat offspring with prenatal hyperhomocysteinemia, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2018**, 2746873, doi: 10.1155/2018/2746873.
 28. Yakovleva, O., Bogatova, K., Mukhtarova, R., Yakovlev, A., Shakhmatova, V., Gerasimova, E., Ziyatdinova, G., Hermann, A., and Sitdikova, G. (2020) Hydrogen sulfide alleviates anxiety, motor,

- and cognitive dysfunctions in rats with maternal hyperhomocysteinemia via mitigation of oxidative stress, *Biomolecules*, **10**, 995, doi: 10.3390/biom10070995.
29. Gerasimova, E., Burkhanova, G., Chernova, K., Zakharov, A., Enikeev, D., Khaertdinov, N., Giniatullin, R., and Sitdikova, G. (2021) Hyperhomocysteinemia increases susceptibility to cortical spreading depression associated with photophobia, mechanical allodynia, and anxiety in rats, *Behav. Brain Res.*, **409**, 113324, doi: 10.1016/j.bbr.2021.113324.
30. Gerasimova, E., Yakovleva, O., Enikeev, D., Bogatova, K., Hermann, A., Giniatullin, R., and Sitdikova, G. (2022) Hyperhomocysteinemia increases cortical excitability and aggravates mechanical hyperalgesia and anxiety in a nitroglycerine-induced migraine model in rats, *Biomolecules*, **12**, 735, doi: 10.3390/biom12050735.
31. Hassan, Z., Coelho, D., Kokten, T., Alberto, J. M., Umoret, R., Daval, J. L., Gueant, J. L., Bossenmeyer-Pourie, C., and Pourie, G. (2019) Brain susceptibility to methyl donor deficiency: from fetal programming to aging outcome in rats, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 5692, doi: 10.3390/ijms20225692.
32. Pourie, G., Martin, N., Daval, J. L., Alberto, J. M., Umoret, R., Gueant, J. L., and Bossenmeyer-Pourie, C. (2020) The stimulation of neurogenesis improves the cognitive status of aging rats subjected to gestational and perinatal deficiency of B9-12 vitamins, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8008, doi: 10.3390/ijms21218008.
33. Figueiro, P.W., de Moreira, D. S., Dos Santos, T. M., Prezzi, C. A., Rohden, F., Faccioni-Heuser, M. C., Manfredini, V., Netto, C. A., and Wyse, A. T. S. (2019) The neuroprotective role of melatonin in a gestational hypermethioninemia model, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **78**, 198-209, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2019.08.004.
34. Schweinberger, B. M., Rodrigues, A. F., Dos Santos, T. M., Rohden, F., Barbosa, S., da Luz Soster, P. R., Partata, W. A., Faccioni-Heuser, M. C., and Wyse, A. T. S. (2018) Methionine administration in pregnant rats causes memory deficit in the offspring and alters ultrastructure in brain tissue, *Neurotox. Res.*, **33**, 239-246, doi: 10.1007/s12640-017-9830-x.
35. Zhou, D., Li, Z., Sun, Y., Yan, J., Huang, G., and Li, W. (2022) Early life stage folic acid deficiency delays the neurobehavioral development and cognitive function of rat offspring by hindering *de novo* telomere synthesis, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 6948, doi: 10.3390/ijms23136948.
36. Degroote, S., Hunting, D., and Takser, L. (2018) Periconceptional folate deficiency leads to autism-like traits in Wistar rat offspring, *Neurotoxicol. Teratol.*, **66**, 132-138, doi: 10.1016/j.ntt.2017.12.008.
37. Makhro, A. V., Mashkina, A. P., Solenaya, O. A., Trunova, O. A., Kozina, L. S., Arutyunian, A. V., and Bulygina, E. R. (2008) Prenatal hyperhomocysteinemia as a model of oxidative stress of the brain, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **146**, 33-35, doi: 10.1007/s10517-008-0233-0.
38. Postnikova, T. Y., Amakhin, D. V., Trofimova, A. M., Tumanova, N. L., Dubrovskaya, N. M., Kalinina, D. S., Kovalenko, A. A., Shcherbitskaia, A. D., Vasilev, D. S., and Zaitsev, A. V. (2022) Maternal hyperhomocysteinemia produces memory deficits associated with impairment of long-term synaptic plasticity in young rats, *Cells*, **12**, 58, doi: 10.3390/cells12010058.
39. Imbard, A., Benoist, J. F., and Blom, H. J. (2013) Neural tube defects, folic acid and methylation, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **10**, 4352-4389, doi: 10.3390/ijerph10094352.
40. Tang, K. F., Li, Y. L., and Wang, H. Y. (2015) Quantitative assessment of maternal biomarkers related to one-carbon metabolism and neural tube defects, *Sci. Rep.*, **5**, 8510, doi: 10.1038/srep08510.
41. Murphy, M. M., Fernandez-Ballart, J. D., Molloy, A. M., and Canals, J. (2017) Moderately elevated maternal homocysteine at preconception is inversely associated with cognitive performance in children 4 months and 6 years after birth, *Matern. Child Nutr.*, **13**, e12289, doi: 10.1111/mcn.12289.
42. Campoy, C., Azaryah, H., Torres-Espinola, F. J., Martinez-Zaldivar, C., Garcia-Santos, J. A., Demmel-mair, H., Haile, G., Gyorei, E., Ramirez-Tortosa, M. D. C., Reischl, E., Rzehak, P., Molloy, A. M., Decsi, T., Luna, J. D., Koletzko, B., and Perez-Garcia, M. (2020) Long-chain polyunsaturated fatty acids, homocysteine at birth and fatty acid desaturase gene cluster polymorphisms are associated with Children's processing speed up to age 9 years, *Nutrients*, **13**, 131, doi: 10.3390/nu13010131.
43. Srinivasan, K., Thomas, T., Kapanee, A. R., Ramthal, A., Bellinger, D. C., Bosch, R. J., Kurpad, A. V., and Duggan, C. (2017) Effects of maternal vitamin B₁₂ supplementation on early infant neurocognitive outcomes: a randomized controlled clinical trial, *Matern. Child Nutr.*, **13**, e12325, doi: 10.1111/mcn.12325.
44. Ars, C. L., Nijs, I. M., Marroun, H. E., Muetzel, R., Schmidt, M., Steenweg-de Graaff, J., van der Lugt, A., Jaddoe, V. W., Hofman, A., Steegers, E. A., Verhulst, F. C., Tiemeier, H., and White, T. (2019) Prenatal folate, homocysteine and vitamin B₁₂ levels and child brain volumes, cognitive development and psychological functioning: the generation R study, *Br. J. Nutr.*, **122**, S1-S9, doi: 10.1017/S0007114515002081.
45. Boldyrev, A. A. (2009) Molecular mechanisms of homocysteine toxicity, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 589-598, doi: 10.1134/s0006297909060017.
46. Troen, A. M. (2005) The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **29**, 1140-1151, doi: 10.1016/j.pnpbp.2005.06.025.
47. Esse, R., Barroso, M., Tavares de Almeida, I., and Castro, R. (2019) The contribution of homocysteine

- metabolism disruption to endothelial dysfunction: state-of-the-art, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 867, doi: 10.3390/ijms20040867.
48. Faverzani, J. L., Hammerschmidt, T. G., Sitta, A., Deon, M., Wajner, M., and Vargas, C. R. (2017) Oxidative stress in homocystinuria due to cystathionine ss-synthase deficiency: findings in patients and in animal models, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **37**, 1477-1485, doi: 10.1007/s10571-017-0478-0.
 49. Lehotsky, J., Tothova, B., Kovalska, M., Dobrota, D., Benova, A., Kalenska, D., and Kaplan, P. (2016) Role of homocysteine in the ischemic stroke and development of ischemic tolerance, *Front. Neurosci.*, **10**, 538, doi: 10.3389/fnins.2016.00538.
 50. Sibarov, D. A., Abushik, P. A., Giniatullin, R., and Antonov, S. M. (2016) GluN2A subunit-containing NMDA receptors are the preferential neuronal targets of homocysteine, *Front. Cell. Neurosci.*, **10**, 246, doi: 10.3389/fncel.2016.00246.
 51. Poddar, R. (2021) Hyperhomocysteinemia is an emerging comorbidity in ischemic stroke, *Exp. Neurol.*, **336**, 113541, doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113541.
 52. Sharma, G. S., Kumar, T., Dar, T. A., and Singh, L. R. (2015) Protein N-homocysteinylation: From cellular toxicity to neurodegeneration, *Biochim. Biophys. Acta*, **1850**, 2239-2245, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.08.013.
 53. Jakubowski, H. (2019) Homocysteine modification in protein structure/function and human disease, *Physiol. Rev.*, **99**, 555-604, doi: 10.1152/physrev.00003.2018.
 54. Selhub, J. (1999) Homocysteine metabolism, *Annu. Rev. Nutr.*, **19**, 217-246, doi: 10.1146/annurev.nutr.19.1.217.
 55. Gueant, J. L., Namour, F., Gueant-Rodriguez, R. M., and Daval, J. L. (2013) Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol. Metab.*, **24**, 279-289, doi: 10.1016/j.tem.2013.01.010.
 56. James, S. J., Melnyk, S., Pogribna, M., Pogribny, I. P., and Caudill, M. A. (2002) Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology, *J. Nutr.*, **132**, 2361S-2366S, doi: 10.1093/jn/132.8.2361S.
 57. Hannibal, L., and Blom, H. J. (2017) Homocysteine and disease: causal associations or epiphenomenons? *Mol. Aspects Med.*, **53**, 36-42, doi: 10.1016/j.mam.2016.11.003.
 58. Dayal, S., and Lentz, S. R. (2008) Murine models of hyperhomocysteinemia and their vascular phenotypes, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**, 1596-1605, doi: 10.1161/ATVBAHA.108.166421.
 59. McGee, M., Bainbridge, S., and Fontaine-Bisson, B. (2018) A crucial role for maternal dietary methyl donor intake in epigenetic programming and fetal growth outcomes, *Nutr. Rev.*, **76**, 469-478, doi: 10.1093/nutrit/nuy006.
 60. Heil, S. G., Herzog, E. M., Griffioen, P. H., van Zelst, B., Willemsen, S. P., de Rijke, Y. B., Steegers-Theunissen, R. P. M., and Steegers, E. A. P. (2019) Lower S-adenosylmethionine levels and DNA hypomethylation of placental growth factor (PIGF) in placental tissue of early-onset preeclampsia-complicated pregnancies, *PLoS One*, **14**, e0226969, doi: 10.1371/journal.pone.0226969.
 61. Lin, N., Qin, S., Luo, S., Cui, S., Huang, G., and Zhang, X. (2014) Homocysteine induces cytotoxicity and proliferation inhibition in neural stem cells via DNA methylation *in vitro*, *FEBS J.*, **281**, 2088-2096, doi: 10.1111/febs.12764.
 62. Perla-Kajan, J., and Jakubowski, H. (2019) Dysregulation of epigenetic mechanisms of gene expression in the pathologies of hyperhomocysteinemia, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 3140, doi: 10.3390/ijms20133140.
 63. Kim, K. C., Friso, S., and Choi, S. W. (2009) DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging, *J. Nutr. Biochem.*, **20**, 917-926, doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.06.008.
 64. Bhutani, N., Burns, D. M., and Blau, H. M. (2011) DNA demethylation dynamics, *Cell*, **146**, 866-872, doi: 10.1016/j.cell.2011.08.042.
 65. Freitag, M., and Selker, E. U. (2005) Controlling DNA methylation: many roads to one modification, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **15**, 191-199, doi: 10.1016/j.jgde.2005.02.003.
 66. Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Paabo, S., Rebhan, M., and Schubeler, D. (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome, *Nat. Genet.*, **39**, 457-466, doi: 10.1038/ng1990.
 67. Jaenisch, R., and Bird, A. (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nat. Genet.*, **33 Suppl.**, 245-254, doi: 10.1038/ng1089.
 68. Mandaviya, P. R., Stolk, L., and Heil, S. G. (2014) Homocysteine and DNA methylation: a review of animal and human literature, *Mol. Genet. Metab.*, **113**, 243-252, doi: 10.1016/j.ymgme.2014.10.006.
 69. Ito, S., D'Alessio, A. C., Taranova, O. V., Hong, K., Sowers, L. C., and Zhang, Y. (2010) Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification, *Nature*, **466**, 1129-1133, doi: 10.1038/nature09303.
 70. Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D. R., Aravind, L., and Rao, A. (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1, *Science*, **324**, 930-935, doi: 10.1126/science.1170116.
 71. Globisch, D., Munzel, M., Muller, M., Michalakis, S., Wagner, M., Koch, S., Bruckl, T., Biel, M., and Carell, T. (2010) Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates, *PLoS One*, **5**, e15367, doi: 10.1371/journal.pone.0015367.

72. Song, C. X., Szulwach, K. E., Fu, Y., Dai, Q., Yi, C., Li, X., Li, Y., Chen, C. H., Zhang, W., Jian, X., Wang, J., Zhang, L., Looney, T. J., Zhang, B., Godley, L. A., Hicks, L. M., Lahn, B. T., Jin, P., and He, C. (2011) Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine, *Nat. Biotechnol.*, **29**, 68-72, doi: 10.1038/nbt.1732.
73. Szulwach, K. E., Li, X., Li, Y., Song, C. X., Wu, H., Dai, Q., Irier, H., Upadhyay, A. K., Gearing, M., Levey, A. I., Vasanthakumar, A., Godley, L. A., Chang, Q., Cheng, X., He, C., and Jin, P. (2011) 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging, *Nat. Neurosci.*, **14**, 1607-1616, doi: 10.1038/nn.2959.
74. Scott, J. M., Molloy, A. M., Kennedy, D. G., Kennedy, S., and Weir, D. G. (1994) Effects of the disruption of transmethylase in the central nervous system: an animal model, *Acta Neurol. Scand. Suppl.*, **154**, 27-31, doi: 10.1111/j.1600-0404.1994.tb05406.x.
75. Schatz, R. A., Wilens, T. E., and Sellinger, O. Z. (1981) Decreased transmethylase of biogenic amines after *in vivo* elevation of brain S-adenosyl-L-homocysteine, *J. Neurochem.*, **36**, 1739-1748, doi: 10.1111/j.1471-4159.1981.tb00426.x.
76. Esse, R., Imbard, A., Florindo, C., Gupta, S., Quinlivan, E. P., Davids, M., Teerlink, T., Tavares de Almeida, I., Kruger, W. D., Blom, H. J., and Castro, R. (2014) Protein arginine hypomethylation in a mouse model of cystathionine beta-synthase deficiency, *FASEB J.*, **28**, 2686-2695, doi: 10.1096/fj.13-246579.
77. Lee, H. O., Wang, L., Kuo, Y. M., Gupta, S., Slifker, M. J., Li, Y. S., Andrews, A. J., and Kruger, W. D. (2017) Lack of global epigenetic methylation defects in CBS deficient mice, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **40**, 113-120, doi: 10.1007/s10545-016-9958-5.
78. DiBello, P. M., Dayal, S., Kaveti, S., Zhang, D., Kinter, M., Lentz, S. R., and Jacobsen, D. W. (2010) The nutrigenetics of hyperhomocysteinemia: quantitative proteomics reveals differences in the methionine cycle enzymes of gene-induced versus diet-induced hyperhomocysteinemia, *Mol. Cell. Proteomics*, **9**, 471-485, doi: 10.1074/mcp.M900406-MCP200.
79. Suszynska-Zajczyk, J., and Jakubowski, H. (2014) Paraoxonase 1 and dietary hyperhomocysteinemia modulate the expression of mouse proteins involved in liver homeostasis, *Acta Biochim. Pol.*, **61**, 815-823, doi: 10.18388/abp.2014_1851.
80. Li, J. G., Barrero, C., Gupta, S., Kruger, W. D., Merali, S., and Pratico, D. (2017) Homocysteine modulates 5-lipoxygenase expression level via DNA methylation, *Aging Cell*, **16**, 273-280, doi: 10.1111/acer.12550.
81. Pogribny, I. P., Karpf, A. R., James, S. R., Melnyk, S., Han, T., and Tryndyak, V. P. (2008) Epigenetic alterations in the brains of Fisher 344 rats induced by long-term administration of folate/methyl-deficient diet, *Brain Res.*, **1237**, 25-34, doi: 10.1016/j.brainres.2008.07.077.
82. Kalani, A., Kamat, P. K., Famil'tseva, A., Chaturvedi, P., Muradashvili, N., Narayanan, N., Tyagi, S. C., and Tyagi, N. (2014) Role of microRNA29b in blood-brain barrier dysfunction during hyperhomocysteinemia: an epigenetic mechanism, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **34**, 1212-1222, doi: 10.1038/jcbfm.2014.74.
83. Kalani, A., Kamat, P. K., Givvimani, S., Brown, K., Metreveli, N., Tyagi, S. C., and Tyagi, N. (2014) Nutri-epigenetics ameliorates blood-brain barrier damage and neurodegeneration in hyperhomocysteinemia: role of folic acid, *J. Mol. Neurosci.*, **52**, 202-215, doi: 10.1007/s12031-013-0122-5.
84. Fan, G., Beard, C., Chen, R. Z., Csankovszki, G., Sun, Y., Siniaia, M., Biniszkiwicz, D., Bates, B., Lee, P. P., Kuhn, R., Trumpp, A., Poon, C., Wilson, C. B., and Jaenisch, R. (2001) DNA hypomethylation perturbs the function and survival of CNS neurons in postnatal animals, *J. Neurosci.*, **21**, 788-797, doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-03-00788.2001.
85. Hutnick, L. K., Golshani, P., Namihira, M., Xue, Z., Matynia, A., Yang, X. W., Silva, A. J., Schweizer, F. E., and Fan, G. (2009) DNA hypomethylation restricted to the murine forebrain induces cortical degeneration and impairs postnatal neuronal maturation, *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 2875-2888, doi: 10.1093/hmg/ddp222.
86. Liu, H. Y., Liu, S. M., and Zhang, Y. Z. (2020) Maternal folic acid supplementation mediates offspring health via DNA methylation, *Reprod. Sci.*, **27**, 963-976, doi: 10.1007/s43032-020-00161-2.
87. Li, W., Li, Z., Li, S., Wang, X., Wilson, J. X., and Huang, G. (2018) Periconceptional folic acid supplementation benefit to development of early sensory-motor function through increase DNA methylation in rat offspring, *Nutrients*, **10**, 292, doi: 10.3390/nu10030292.
88. Wang, X., Li, Z., Zhu, Y., Yan, J., Liu, H., Huang, G., and Li, W. (2021) Maternal folic acid impacts DNA methylation profile in male rat offspring implicated in neurodevelopment and learning/memory abilities, *Genes Nutr.*, **16**, 1, doi: 10.1186/s12263-020-00681-1.
89. Karpova, N. N. (2014) Role of BDNF epigenetics in activity-dependent neuronal plasticity, *Neuropharmacology*, **76 Pt C**, 709-718, doi: 10.1016/j.neuropharm.2013.04.002.
90. Irwin, R. E., Pentieva, K., Cassidy, T., Lees-Murdock, D. J., McLaughlin, M., Prasad, G., McNulty, H., and Walsh, C. P. (2016) The interplay between DNA methylation, folate and neurocognitive development, *Epigenomics*, **8**, 863-879, doi: 10.2217/epi-2016-0003.
91. Martinowich, K., Hattori, D., Wu, H., Fouse, S., He, F., Hu, Y., Fan, G., and Sun, Y. E. (2003) DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation, *Science*, **302**, 890-893, doi: 10.1126/science.1090842.
92. Chen, W. G., Chang, Q., Lin, Y., Meissner, A., West, A. E., Griffith, E. C., Jaenisch, R., and Greenberg, M. E. (2003) Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of

- MeCP2, *Science*, **302**, 885-889, doi: 10.1126/science.1086446.
93. Feng, J., Fouse, S., and Fan, G. (2007) Epigenetic regulation of neural gene expression and neuronal function, *Pediatr. Res.*, **61**, 58R-63R, doi: 10.1203/pdr.0b013e3180457635.
 94. Dhobale, M. V., Pisal, H. R., Mehendale, S. S., and Joshi, S. R. (2013) Differential expression of human placental neurotrophic factors in preterm and term deliveries, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **31**, 719-723, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2013.09.006.
 95. Dhobale, M. (2017) Neurotrophic factors and maternal nutrition during pregnancy, *Vitam. Horm.*, **104**, 343-366, doi: 10.1016/bs.vh.2016.10.011.
 96. Geng, H., Chen, H., Wang, H., and Wang, L. (2021) The histone modifications of neuronal plasticity, *Neural. Plast.*, **2021**, 6690523, doi: 10.1155/2021/6690523.
 97. Parrish, R. R., Buckingham, S. C., Mascia, K. L., Johnson, J. J., Matyjasik, M. M., Lockhart, R. M., and Lubin, F. D. (2015) Methionine increases BDNF DNA methylation and improves memory in epilepsy, *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, **2**, 401-416, doi: 10.1002/acn3.183.
 98. Xu, P., Pang, D., Zhou, J., Li, S., Chen, D., and Yu, B. (2021) Behavioral changes and brain epigenetic alterations induced by maternal deficiencies of B vitamins in a mouse model, *Psychopharmacology (Berl)*, **238**, 1213-1222, doi: 10.1007/s00213-021-05766-2.
 99. Yan, Z., Jiao, F., Yan, X., and Ou, H. (2017) Maternal chronic folate supplementation ameliorates behavior disorders induced by prenatal high-fat diet through methylation alteration of BDNF and Grin2b in offspring hippocampus, *Mol. Nutr. Food Res.*, **61**, 1700461, doi: 10.1002/mnfr.201700461.
 100. Sukanuma, T., and Workman, J. L. (2011) Signals and combinatorial functions of histone modifications, *Annu. Rev. Biochem.*, **80**, 473-499, doi: 10.1146/annurev-biochem-061809-175347.
 101. Hyun, K., Jeon, J., Park, K., and Kim, J. (2017) Writing, erasing and reading histone lysine methylations, *Exp. Mol. Med.*, **49**, e324, doi: 10.1038/emm.2017.11.
 102. Collins, B. E., Greer, C. B., Coleman, B. C., and Sweatt, J. D. (2019) Histone H3 lysine K4 methylation and its role in learning and memory, *Epigenetics Chromatin*, **12**, 7, doi: 10.1186/s13072-018-0251-8.
 103. Mentch, S. J., Mehrmohamadi, M., Huang, L., Liu, X., Gupta, D., Mattocks, D., Gomez Padilla, P., Ables, G., Bamman, M. M., Thalacker-Mercer, A. E., Nichenametla, S. N., and Locasale, J. W. (2015) Histone methylation dynamics and gene regulation occur through the sensing of one-carbon metabolism, *Cell Metab.*, **22**, 861-873, doi: 10.1016/j.cmet.2015.08.024.
 104. Shen, W., Gao, C., Cueto, R., Liu, L., Fu, H., Shao, Y., Yang, W. Y., Fang, P., Choi, E. T., Wu, Q., Yang, X., and Wang, H. (2020) Homocysteine-methionine cycle is a metabolic sensor system controlling methylation-regulated pathological signaling, *Redox Biol.*, **28**, 101322, doi: 10.1016/j.redox.2019.101322.
 105. Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., and Bird, A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex, *Nature*, **393**, 386-389, doi: 10.1038/30764.
 106. Lu, Y., Liu, Y., Liao, S., Tu, W., Shen, Y., Yan, Y., Tao, D., Lu, Y., Ma, Y., Yang, Y., and Zhang, S. (2016) Epigenetic modifications promote the expression of the orphan nuclear receptor NR0B1 in human lung adenocarcinoma cells, *Oncotarget*, **7**, 43162-43176, doi: 10.18632/oncotarget.9012.
 107. Rothbart, S. B., and Strahl, B. D. (2014) Interpreting the language of histone and DNA modifications, *Biochim. Biophys. Acta*, **1839**, 627-643, doi: 10.1016/j.bbagr.2014.03.001.
 108. Gurda, D., Handschuh, L., Kotkowiak, W., and Jakubowski, H. (2015) Homocysteine thiolactone and N-homocysteinylation induce pro-atherogenic changes in gene expression in human vascular endothelial cells, *Amino Acids*, **47**, 1319-1339, doi: 10.1007/s00726-015-1956-7.
 109. Chaturvedi, P., Kalani, A., Givvimani, S., Kamat, P. K., Familtseva, A., and Tyagi, S. C. (2014) Differential regulation of DNA methylation versus histone acetylation in cardiomyocytes during HHcy *in vitro* and *in vivo*: an epigenetic mechanism, *Physiol. Genomics*, **46**, 245-255, doi: 10.1152/physiolgenomics.00168.2013.
 110. Tothova, B., Kovalska, M., Kalenska, D., Tomascova, A., and Lehotsky, J. (2018) Histone hyperacetylation as a response to global brain ischemia associated with hyperhomocysteinemia in rats, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 3147, doi: 10.3390/ijms19103147.
 111. Tremolizzo, L., Doueiri, M. S., Dong, E., Grayson, D. R., Davis, J., Pinna, G., Tueting, P., Rodriguez-Menendez, V., Costa, E., and Guidotti, A. (2005) Valproate corrects the schizophrenia-like epigenetic behavioral modifications induced by methionine in mice, *Biol. Psychiatry*, **57**, 500-509, doi: 10.1016/j.biopsych.2004.11.046.
 112. Dong, E., Guidotti, A., Grayson, D. R., and Costa, E. (2007) Histone hyperacetylation induces demethylation of reelin and 67-kDa glutamic acid decarboxylase promoters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 4676-4681, doi: 10.1073/pnas.0700529104.
 113. Ma, Q., and Zhang, L. (2015) Epigenetic programming of hypoxic-ischemic encephalopathy in response to fetal hypoxia, *Prog. Neurobiol.*, **124**, 28-48, doi: 10.1016/j.pneurobio.2014.11.001.
 114. Wellmann, S., Bettkober, M., Zelmer, A., Seeger, K., Faigle, M., Eltzhig, H. K., and Buhner, C. (2008) Hypoxia upregulates the histone demethylase JMJD1A via HIF-1, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **372**, 892-897, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.05.150.

115. MacLennan, N. K., James, S. J., Melnyk, S., Piroozii, A., Jernigan, S., Hsu, J. L., Janke, S. M., Pham, T. D., and Lane, R. H. (2004) Uteroplacental insufficiency alters DNA methylation, one-carbon metabolism, and histone acetylation in IUGR rats, *Physiol. Genomics*, **18**, 43-50, doi: 10.1152/physiolgenomics.00042.2004.
116. Won, S. B., Han, A., and Kwon, Y. H. (2017) Maternal consumption of low-isoflavone soy protein isolate alters hepatic gene expression and liver development in rat offspring, *J. Nutr. Biochem.*, **42**, 51-61, doi: 10.1016/j.jnutbio.2016.12.013.
117. Durbagula, S., Korlimarla, A., Ravikumar, G., Valiya Parambath, S., Kaku, S. M., and Visweswariah, A. M. (2022) Prenatal epigenetic factors are predisposing for neurodevelopmental disorders – considering placenta as a model, *Birth Defects Res.*, **114**, 1324-1342, doi: 10.1002/bdr2.2119.
118. Rosenfeld, C. S. (2021) The placenta-brain-axis, *J. Neurosci. Res.*, **99**, 271-283, doi: 10.1002/jnr.24603.
119. Behura, S. K., Dhakal, P., Kelleher, A. M., Balboula, A., Patterson, A., and Spencer, T. E. (2019) The brain-placental axis: therapeutic and pharmacological relevancy to pregnancy, *Pharmacol. Res.*, **149**, 104468, doi: 10.1016/j.phrs.2019.104468.
120. Shallie, P. D., and Naicker, T. (2019) The placenta as a window to the brain: A review on the role of placental markers in prenatal programming of neurodevelopment, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **73**, 41-49, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2019.01.003.
121. D'Souza, S. W., and Glazier, J. D. (2022) Homocysteine metabolism in pregnancy and developmental impacts, *Front. Cell Dev. Biol.*, **10**, 802285, doi: 10.3389/fcell.2022.802285.
122. Geng, Y., Gao, R., Chen, X., Liu, X., Liao, X., Li, Y., Liu, S., Ding, Y., Wang, Y., and He, J. (2015) Folate deficiency impairs decidualization and alters methylation patterns of the genome in mice, *Mol. Hum. Reprod.*, **21**, 844-856, doi: 10.1093/molehr/gav045.
123. Kim, J. M., Hong, K., Lee, J. H., Lee, S., and Chang, N. (2009) Effect of folate deficiency on placental DNA methylation in hyperhomocysteinemic rats, *J. Nutr. Biochem.*, **20**, 172-176, doi: 10.1016/j.jnutbio.2008.01.010.
124. Park, B. H., Kim, Y. J., Park, J. S., Lee, H. Y., Ha, E. H., Min, J. W., and Park, H. S. (2005) Folate and homocysteine levels during pregnancy affect DNA methylation in human placenta [in Korean], *J. Prev. Med. Public Health*, **38**, 437-442.
125. Kulkarni, A., Dangat, K., Kale, A., Sable, P., Chavan-Gautam, P., and Joshi, S. (2011) Effects of altered maternal folic acid, vitamin B₁₂ and docosahexaenoic acid on placental global DNA methylation patterns in Wistar rats, *PLoS One*, **6**, e17706, doi: 10.1371/journal.pone.0017706.
126. Li, B., Chang, S., Liu, C., Zhang, M., Zhang, L., Liang, L., Li, R., Wang, X., Qin, C., Zhang, T., Niu, B., and Wang, L. (2019) Low maternal dietary folate alters retrotranspose by methylation regulation in intrauterine growth retardation (IUGR) fetuses in a mouse model, *Med. Sci. Monit.*, **25**, 3354-3365, doi: 10.12659/MSM.914292.
127. Dai, C., Fei, Y., Li, J., Shi, Y., and Yang, X. (2021) A novel review of homocysteine and pregnancy complications, *Biomed. Res. Int.*, **2021**, 6652231, doi: 10.1155/2021/6652231.
128. Nomura, Y., Lambertini, L., Rialdi, A., Lee, M., Mystal, E. Y., Grabie, M., Manaster, I., Huynh, N., Finik, J., Davey, M., Davey, K., Ly, J., Stone, J., Loudon, H., Eglinton, G., Hurd, Y., Newcorn, J. H., and Chen, J. (2014) Global methylation in the placenta and umbilical cord blood from pregnancies with maternal gestational diabetes, preeclampsia, and obesity, *Reprod. Sci.*, **21**, 131-137, doi: 10.1177/1933719113492206.
129. Lecuyer, M., Laquerriere, A., Bekri, S., Lesueur, C., Ramdani, Y., Jegou, S., Uguen, A., Marcorelles, P., Marret, S., and Gonzalez, B. J. (2017) PLGF, a placental marker of fetal brain defects after in utero alcohol exposure, *Acta Neuropathol. Commun.*, **5**, 44, doi: 10.1186/s40478-017-0444-6.
130. Rahat, B., Hamid, A., Bagga, R., and Kaur, J. (2022) Folic acid levels during pregnancy regulate trophoblast invasive behavior and the possible development of preeclampsia, *Front. Nutr.*, **9**, 847136, doi: 10.3389/fnut.2022.847136.
131. Meister, S., Hahn, L., Beyer, S., Paul, C., Mitter, S., Kuhn, C., von Schonfeldt, V., Corradini, S., Sudan, K., Schulz, C., Kolben, T. M., Mahner, S., Jeschke, U., and Kolben, T. (2021) Regulation of epigenetic modifications in the placenta during preeclampsia: PPARgamma influences H3K4me3 and H3K9ac in extravillous trophoblast cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12469, doi: 10.3390/ijms222212469.
132. Sheng, W., Gu, Y., Chu, X., Morgan, J. A., Cooper, D. B., Lewis, D. F., McCathran, C. E., and Wang, Y. (2021) Upregulation of histone H3K9 methylation in fetal endothelial cells from preeclamptic pregnancies, *J. Cell. Physiol.*, **236**, 1866-1874, doi: 10.1002/jcp.29970.
133. Morales-Prieto, D. M., Chaiwangyen, W., Ospina-Prieto, S., Schneider, U., Herrmann, J., Gruhn, B., and Markert, U. R. (2012) MicroRNA expression profiles of trophoblastic cells, *Placenta*, **33**, 725-734, doi: 10.1016/j.placenta.2012.05.009.
134. Xie, L., Mouillet, J. F., Chu, T., Parks, W. T., Sadovsky, E., Knofler, M., and Sadovsky, Y. (2014) C19MC microRNAs regulate the migration of human trophoblasts, *Endocrinology*, **155**, 4975-4985, doi: 10.1210/en.2014-1501.
135. Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L., and Chen, C. (2007) Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues, *BMC Genomics*, **8**, 166, doi: 10.1186/1471-2164-8-166.

136. Gunel, T., Kamali, N., Hosseini, M. K., Gumusoglu, E., Benian, A., and Aydinli, K. (2020) Regulatory effect of miR-195 in the placental dysfunction of preeclampsia, *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, **33**, 901-908, doi: 10.1080/14767058.2018.1508439.
137. Li, J., Du, J., Wang, Z., Wang, C., Bai, J., and Zhang, S. (2018) Expression of miR-376 in blood of pregnant women with preeclampsia and its effect on 25-hydroxyvitamin D, *Exp. Ther. Med.*, **16**, 1701-1706, doi: 10.3892/etm.2018.6394.
138. Lv, Y., Lu, C., Ji, X., Miao, Z., Long, W., Ding, H., and Lv, M. (2019) Roles of microRNAs in preeclampsia, *J. Cell. Physiol.*, **234**, 1052-1061, doi: 10.1002/jcp.27291.
139. Cai, M., Kolluru, G. K., and Ahmed, A. (2017) Small molecule, big prospects: microRNA in pregnancy and its complications, *J. Pregnancy*, **2017**, 6972732, doi: 10.1155/2017/6972732.
140. Chen, D. B., and Wang, W. (2013) Human placental microRNAs and preeclampsia, *Biol. Reprod.*, **88**, 130, doi: 10.1095/biolreprod.113.107805.
141. Fu, G., Brkic, J., Hayder, H., and Peng, C. (2013) MicroRNAs in human placental development and pregnancy complications, *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 5519-5544, doi: 10.3390/ijms14035519.
142. Escudero, C. A., Herlitz, K., Troncoso, F., Acurio, J., Aguayo, C., Roberts, J. M., Truong, G., Duncombe, G., Rice, G., and Salomon, C. (2016) Role of extracellular vesicles and microRNAs on dysfunctional angiogenesis during preeclamptic pregnancies, *Front. Physiol.*, **7**, 98, doi: 10.3389/fphys.2016.00098.
143. Rudov, A., Balduini, W., Carloni, S., Perrone, S., Buonocore, G., and Albertini, M. C. (2014) Involvement of miRNAs in placental alterations mediated by oxidative stress, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2014**, 103068, doi: 10.1155/2014/103068.
144. Sonkar, R., Kay, M. K., and Choudhury, M. (2019) PFOS modulates interactive epigenetic regulation in first-trimester human trophoblast cell line HTR-8/SVneo, *Chem. Res. Toxicol.*, **32**, 2016-2027, doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00198.
145. Gold, A. R., and Glanzman, D. L. (2021) The central importance of nuclear mechanisms in the storage of memory, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **564**, 103-113, doi: 10.1016/j.bbrc.2021.04.125.
146. Jobe, E. M., and Zhao, X. (2017) DNA methylation and adult neurogenesis, *Brain Plast.*, **3**, 5-26, doi: 10.3233/BPL-160034.
147. Graff, J., and Mansuy, I. M. (2008) Epigenetic codes in cognition and behaviour, *Behav. Brain Res.*, **192**, 70-87, doi: 10.1016/j.bbr.2008.01.021.
148. Wood, M. A., Hawk, J. D., and Abel, T. (2006) Combinatorial chromatin modifications and memory storage: a code for memory? *Learn Mem.*, **13**, 241-244, doi: 10.1101/lm.278206.
149. Hwang, J. Y., Aromolaran, K. A., and Zukin, R. S. (2017) The emerging field of epigenetics in neurodegeneration and neuroprotection, *Nat. Rev. Neurosci.*, **18**, 347-361, doi: 10.1038/nrn.2017.46.
150. Duman, R. S., and Aghajanian, G. K. (2012) Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets, *Science*, **338**, 68-72, doi: 10.1126/science.1222939.
151. Uchida, S., Yamagata, H., Seki, T., and Watanabe, Y. (2018) Epigenetic mechanisms of major depression: targeting neuronal plasticity, *Psychiatry Clin. Neurosci.*, **72**, 212-227, doi: 10.1111/pcn.12621.
152. Kubota, T., Miyake, K., Hariya, N., and Mochizuki, K. (2015) Understanding the epigenetics of neurodevelopmental disorders and DOHaD, *J. Dev. Orig. Health Dis.*, **6**, 96-104, doi: 10.1017/S2040174415000057.
153. Matrisciano, F., Tueting, P., Dalal, I., Kadriu, B., Grayson, D. R., Davis, J. M., Nicoletti, F., and Guidotti, A. (2013) Epigenetic modifications of GABAergic interneurons are associated with the schizophrenia-like phenotype induced by prenatal stress in mice, *Neuropharmacology*, **68**, 184-194, doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.04.013.
154. Weaver, I. C., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., Dymov, S., Szyf, M., and Meaney, M. J. (2004) Epigenetic programming by maternal behavior, *Nat. Neurosci.*, **7**, 847-854, doi: 10.1038/nn1276.
155. Kubota, T. (2018) Preemptive epigenetic medicine based on fetal programming, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1012**, 85-95, doi: 10.1007/978-981-10-5526-3_9.
156. Arutyunyan, A. V., Zaloznyaya, I. V., Kerkeshko, G. O., Milyutina, Y. P., and Korenevskii, A. V. (2017) Prenatal hyperhomocysteinemia impairs hypothalamic regulation of reproductive cycles in rat progeny, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **162**, 738-740, doi: 10.1007/S10517-017-3701-6.
157. Wang, X., Li, W., Li, Z., Ma, Y., Yan, J., Wilson, J. X., and Huang, G. (2019) Maternal folic acid supplementation during pregnancy promotes neurogenesis and synaptogenesis in neonatal rat offspring, *Cereb. Cortex*, **29**, 3390-3397, doi: 10.1093/cercor/bhy207.
158. Loureiro, S. O., Heimfarth, L., Pelaez Pde, L., Vanzin, C. S., Viana, L., Wyse, A. T., and Pessoa-Pureur, R. (2008) Homocysteine activates calcium-mediated cell signaling mechanisms targeting the cytoskeleton in rat hippocampus, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **26**, 447-455, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2008.03.001.
159. Lockhart, B., Jones, C., Cuisinier, C., Villain, N., Peyroulan, D., and Lestage, P. (2000) Inhibition of L-homocysteic acid and buthionine sulphoximine-mediated neurotoxicity in rat embryonic neuronal cultures with alpha-lipoic acid enantiomers, *Brain Res.*, **855**, 292-297, doi: 10.1016/s0006-8993(99)02372-0.
160. Takeuchi, H., Iba, M., Inoue, H., Higuchi, M., Takao, K., Tsukita, K., Karatsu, Y., Iwamoto, Y., Miyakawa, T., Suhara, T., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., and Takahashi, R. (2011) P301S mutant human tau transgenic mice manifest early symptoms of human tauopathies with dementia and altered sensorimotor

- gating, *PLoS One*, **6**, e21050, doi: 10.1371/journal.pone.0021050.
161. Милютин Ю. П., Арутюнян А. В., Пустыгина А. В., Щербицкая А. Д., Залозная И. В., Зорина И. И. (2014) Содержание катехоламинов в надпочечниках крысят, перенесших пренатальную гипергомоцистеинемию, *Росс. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова*, **100**, 360-369.
162. Algaidi, S. A., Christie, L. A., Jenkinson, A. M., Whalley, L., Riedel, G., and Platt, B. (2006) Long-term homocysteine exposure induces alterations in spatial learning, hippocampal signalling and synaptic plasticity, *Exp. Neurol.*, **197**, 8-21, doi: 10.1016/j.expneurol.2005.07.003.
163. Christie, L. A., Riedel, G., Algaidi, S. A., Whalley, L. J., and Platt, B. (2005) Enhanced hippocampal long-term potentiation in rats after chronic exposure to homocysteine, *Neurosci. Lett.*, **373**, 119-124, doi: 10.1016/j.neulet.2004.09.072.
164. Viggiano, A., Viggiano, E., Monda, M., Ingrosso, D., Perna, A. F., and De Luca, B. (2012) Methionine-enriched diet decreases hippocampal antioxidant defences and impairs spontaneous behaviour and long-term potentiation in rats, *Brain Res.*, **1471**, 66-74, doi: 10.1016/j.brainres.2012.06.048.
165. Christie, L. A., Riedel, G., and Platt, B. (2009) Bidirectional alterations of LTP after acute homocysteine exposure, *Behav. Brain Res.*, **205**, 559-563, doi: 10.1016/j.bbr.2009.07.010.
166. Chai, G. S., Jiang, X., Ni, Z. F., Ma, Z. W., Xie, A. J., Cheng, X. S., Wang, Q., Wang, J. Z., and Liu, G. P. (2013) Betaine attenuates Alzheimer-like pathological changes and memory deficits induced by homocysteine, *J. Neurochem.*, **124**, 388-396, doi: 10.1111/jnc.12094.
167. Zeng, P., Shi, Y., Wang, X. M., Lin, L., Du, Y. J., Tang, N., Wang, Q., Fang, Y. Y., Wang, J. Z., Zhou, X. W., Lu, Y., and Tian, Q. (2019) Emodin rescued hyperhomocysteinemia-induced dementia and Alzheimer's disease-like features in rats, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **22**, 57-70, doi: 10.1093/ijnp/pyy090.
168. Mahaman, Y. A. R., Huang, F., Wu, M., Wang, Y., Wei, Z., Bao, J., Salissou, M. T. M., Ke, D., Wang, Q., Liu, R., Wang, J. Z., Zhang, B., Chen, D., and Wang, X. (2018) Moringa Oleifera alleviates homocysteine-induced Alzheimer's disease-like pathology and cognitive impairments, *J. Alzheimers Dis.*, **63**, 1141-1159, doi: 10.3233/JAD-180091.
169. Salissou, M. T. M., Mahaman, Y. A. R., Zhu, F., Huang, F., Wang, Y., Xu, Z., Ke, D., Wang, Q., Liu, R., Wang, J. Z., Zhang, B., and Wang, X. (2018) Methanolic extract of Tamarix Gallica attenuates hyperhomocysteinemia induced AD-like pathology and cognitive impairments in rats, *Aging (Albany NY)*, **10**, 3229-3248, doi: 10.18632/aging.101627.
170. Kamat, P. K., Kyles, P., Kalani, A., and Tyagi, N. (2016) Hydrogen sulfide ameliorates homocysteine-induced Alzheimer's disease-like pathology, blood-brain barrier disruption, and synaptic disorder, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 2451-2467, doi: 10.1007/s12035-015-9212-4.
171. Li, J. G., Barrero, C., Merali, S., and Pratico, D. (2017) Genetic absence of ALOX5 protects from homocysteine-induced memory impairment, tau phosphorylation and synaptic pathology, *Hum. Mol. Genet.*, **26**, 1855-1862, doi: 10.1093/hmg/ddx088.
172. Li, J. G., Barrero, C., Merali, S., and Pratico, D. (2017) Five lipoxygenase hypomethylation mediates the homocysteine effect on Alzheimer's phenotype, *Sci. Rep.*, **7**, 46002, doi: 10.1038/srep46002.
173. Akchiche, N., Bossenmeyer-Pourie, C., Kerek, R., Martin, N., Pourie, G., Koziel, V., Helle, D., Alberto, J. M., Ortiou, S., Camadro, J. M., Leger, T., Gueant, J. L., and Daval, J. L. (2012) Homocysteinylated neuronal proteins contributes to folate deficiency-associated alterations of differentiation, vesicular transport, and plasticity in hippocampal neuronal cells, *FASEB J.*, **26**, 3980-3992, doi: 10.1096/fj.12-205757.
174. Sibarov, D. A., Giniatullin, R., and Antonov, S. M. (2018) High sensitivity of cerebellar neurons to homocysteine is determined by expression of GluN2C and GluN2D subunits of NMDA receptors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **506**, 648-652, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.140.
175. Choe, Y. M., Sohn, B. K., Choi, H. J., Byun, M. S., Seo, E. H., Han, J. Y., Kim, Y. K., Yoon, E. J., Lee, J. M., Park, J., Woo, J. I., and Lee, D. Y. (2014) Association of homocysteine with hippocampal volume independent of cerebral amyloid and vascular burden, *Neurobiol. Aging*, **35**, 1519-1525, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.013.
176. Duan, W., Ladenheim, B., Cutler, R. G., Kruman, I. I., Cadet, J. L., and Mattson, M. P. (2002) Dietary folate deficiency and elevated homocysteine levels endanger dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease, *J. Neurochem.*, **80**, 101-110, doi: 10.1046/j.0022-3042.2001.00676.x.
177. Alachkar, A., Wang, L., Yoshimura, R., Hamzeh, A. R., Wang, Z., Sanathara, N., Lee, S. M., Xu, X., Abbott, G. W., and Civelli, O. (2018) Prenatal one-carbon metabolism dysregulation programs schizophrenia-like deficits, *Mol. Psychiatry*, **23**, 282-294, doi: 10.1038/mp.2017.164.
178. Zhuo, J. M., Wang, H., and Pratico, D. (2011) Is hyperhomocysteinemia an Alzheimer's disease (AD) risk factor, an AD marker, or neither? *Trends Pharmacol. Sci.*, **32**, 562-571, doi: 10.1016/j.tips.2011.05.003.
179. Velazquez, R., Ferreira, E., Winslow, W., Dave, N., Piras, I. S., Naymik, M., Huentelman, M. J., Tran, A., Caccamo, A., and Oddo, S. (2020) Maternal choline supplementation ameliorates Alzheimer's disease pathology by reducing brain homocysteine levels

- across multiple generations, *Mol. Psychiatry*, **25**, 2620–2629, doi: 10.1038/s41380-018-0322-z.
180. Da Silva, V. C., Fernandes, L., Haseyama, E. J., Agamme, A. L., Guerra Shinohara, E. M., Muniz, M. T., and D'Almeida, V. (2014) Effect of vitamin B deprivation during pregnancy and lactation on homocysteine metabolism and related metabolites in brain and plasma of mice offspring, *PLoS One*, **9**, e92683, doi: 10.1371/journal.pone.0092683.
 181. Gulyaeva, N. V. (2017) Molecular mechanisms of neuroplasticity: an expanding universe, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 237–242, doi: 10.1134/S0006297917030014.
 182. Балабан П. М., Гуляева Н. В. (2006) Общность молекулярных механизмов нейропластичности и нейропатологии: интегративный подход, *Росс. Физиол. Журн. им. И.М. Сеченова*, **92**, 145–151.
 183. Bacon, E. R., and Brinton, R. D. (2021) Epigenetics of the developing and aging brain: Mechanisms that regulate onset and outcomes of brain reorganization, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **125**, 503–516, doi: 10.1016/j.neubiorev.2021.02.040.
 184. Liu, X. S., and Jaenisch, R. (2019) Editing the epigenome to tackle brain disorders, *Trends Neurosci.*, **42**, 861–870, doi: 10.1016/j.tins.2019.10.003.
 185. Sheikhi, S., and Saboory, E. (2015) Neuroplasticity changes of rat brain by musical stimuli during fetal period, *Cell J.*, **16**, 448–455, doi: 10.22074/cellj.2015.490.
 186. Remington, R., Bechtel, C., Larsen, D., Samar, A., Doshanjh, L., Fishman, P., Luo, Y., Smyers, K., Page, R., Morrell, C., and Shea, T. B. (2015) A phase II randomized clinical trial of a nutritional formulation for cognition and mood in Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, **45**, 395–405, doi: 10.3233/JAD-142499.
 187. Mischoulon, D., Price, L. H., Carpenter, L. L., Tyrka, A. R., Papakostas, G. I., Baer, L., Dording, C. M., Clain, A. J., Durham, K., Walker, R., Ludington, E., and Fava, M. (2014) A double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial of S-adenosyl-L-methionine (SAME) versus escitalopram in major depressive disorder, *J. Clin. Psychiatry*, **75**, 370–376, doi: 10.4088/JCP.13m08591.
 188. Cho, H. H., Cahill, C. M., Vanderburg, C. R., Scherzer, C. R., Wang, B., Huang, X., and Rogers, J. T. (2010) Selective translational control of the Alzheimer amyloid precursor protein transcript by iron regulatory protein-1, *J. Biol. Chem.*, **285**, 31217–31232, doi: 10.1074/jbc.M110.149161.
 189. Hao, X., Zhou, M., Li, H., and Angres, I. A. (2017) Novel immunoassays to detect methionine adenosyltransferase activity and quantify S-adenosyl-methionine, *FEBS Lett.*, **591**, 1114–1125, doi: 10.1002/1873-3468.12631.
 190. Fontana, A., Cursaro, I., Carullo, G., Gemma, S., Butini, S., and Campiani, G. (2022) A therapeutic perspective of HDAC8 in different diseases: an overview of selective inhibitors, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 10014, doi: 10.3390/ijms231710014.
 191. Colasante, G., Lignani, G., Brusco, S., Di Bernardino, C., Carpenter, J., Giannelli, S., Valassina, N., Bido, S., Ricci, R., Castoldi, V., Marenga, S., Church, T., Massimino, L., Morabito, G., Benfenati, F., Schorge, S., Leocani, L., Kullmann, D. M., and Broccoli, V. (2020) dCas9-based *Scn1a* gene activation restores inhibitory interneuron excitability and attenuates seizures in Dravet syndrome mice, *Mol. Ther.*, **28**, 235–253, doi: 10.1016/j.ymthe.2019.08.018.
 192. Peter, C. J., Saito, A., Hasegawa, Y., Tanaka, Y., Nagpal, M., Perez, G., Alway, E., Espeso-Gil, S., Fayyad, T., Ratner, C., Dincer, A., Gupta, A., Devi, L., Pappas, J. G., Lalonde, F. M., Butman, J. A., Han, J. C., Akbarian, S., and Kamiya, A. (2019) In vivo epigenetic editing of *Sema6a* promoter reverses transcallosal dysconnectivity caused by *C11orf46/Arl14ep* risk gene, *Nat. Commun.*, **11**, 4112, doi: 10.1038/s41467-019-12013-y.
 193. Ricci, R., and Colasante, G. (2021) CRISPR/dCas9 as a therapeutic approach for neurodevelopmental disorders: innovations and limitations compared to traditional strategies, *Dev. Neurosci.*, **43**, 253–261, doi: 10.1159/000515845.
 194. Monayo, S. M., and Liu, X. (2022) The prospective application of melatonin in treating epigenetic dysfunctional diseases, *Front. Pharmacol.*, **13**, 867500, doi: 10.3389/fphar.2022.867500.
 195. Alghamdi, B. S. (2018) The neuroprotective role of melatonin in neurological disorders, *J. Neurosci. Res.*, **96**, 1136–1149, doi: 10.1002/jnr.24220.
 196. Leung, J. W., Cheung, K. K., Ngai, S. P., Tsang, H. W., and Lau, B. W. (2020) Protective effects of melatonin on neurogenesis impairment in neurological disorders and its relevant molecular mechanisms, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 5645, doi: 10.3390/ijms21165645.
 197. Figueiro-Silva, J., Antequera, D., Pascual, C., de la Fuente Revenga, M., Volt, H., Acuna-Castroviejo, D., Rodriguez-Franco, M. I., and Carro, E. (2018) The melatonin analog IQM316 may induce adult hippocampal neurogenesis and preserve recognition memories in mice, *Cell Transplant.*, **27**, 423–437, doi: 10.1177/0963689717721217.
 198. Ghareghani, M., Sadeghi, H., Zibara, K., Danaei, N., Azari, H., and Ghanbari, A. (2017) Melatonin increases oligodendrocyte differentiation in cultured neural stem cells, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **37**, 1319–1324, doi: 10.1007/s10571-016-0450-4.
 199. Li, X., Chen, X., Zhou, W., Ji, S., Li, X., Li, G., Liu, G., Wang, F., and Hao, A. (2017) Effect of melatonin on neuronal differentiation requires CBP/p300-mediated acetylation of histone H3 lysine 14, *Neuroscience*, **364**, 45–59, doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.07.064.
 200. Liu, Y., Zhang, Z., Lv, Q., Chen, X., Deng, W., Shi, K., and Pan, L. (2016) Effects and mecha-

- nisms of melatonin on the proliferation and neural differentiation of PC12 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **478**, 540-545, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.07.093.
201. Kong, X., Li, X., Cai, Z., Yang, N., Liu, Y., Shu, J., Pan, L., and Zuo, P. (2008) Melatonin regulates the viability and differentiation of rat midbrain neural stem cells, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **28**, 569-579, doi: 10.1007/s10571-007-9212-7.
202. Paul, R., and Borah, A. (2015) The potential physiological crosstalk and interrelationship between two sovereign endogenous amines, melatonin and homocysteine, *Life Sci.*, **139**, 97-107, doi: 10.1016/j.lfs.2015.07.031.
203. Karolczak, K., and Watala, C. (2021) Melatonin as a reducer of neuro- and vasculotoxic oxidative stress induced by homocysteine, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 1178, doi: 10.3390/antiox10081178.
204. Liu, J., Mesfin, F. M., Hunter, C. E., Olson, K. R., Shelley, W. C., Brokaw, J. P., Manohar, K., and Markel, T. A. (2022) Recent development of the molecular and cellular mechanisms of hydrogen sulfide gasotransmitter, *Antioxidants (Basel)*, **11**, 1788, doi: 10.3390/antiox11091788.

EPIGENETIC MECHANISMS OF THE MATERNAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA INFLUENCE ON THE PLACENTA FUNCTIONAL STATE AND THE OFFSPRING NERVOUS SYSTEM PLASTICITY

Review

**A. V. Arutjunyan^{1,4*}, Yu. P. Milyutina^{1,2}, A. D. Shcherbitskaia^{1,3},
G. O. Kerkeshko^{1,4}, and I. V. Zalozniaia¹**

¹ *D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive medicine, 199034 St. Petersburg, Russia, E-mail: alexarutjunjan@gmail.com*

² *St. Petersburg State Pediatric Medical University, 194100 St. Petersburg, Russia*

³ *I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 194223 Saint Petersburg, Russia*

⁴ *St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, 197110 St. Petersburg, Russia*

According to modern concepts, the susceptibility to certain diseases, especially to cognitive and neuropsychiatric disorders, can be formed during the period of embryonic development. Adverse factors that affect the mother during pregnancy increase the risk of the pathology development in the postnatal period. Despite the relationship found between elevated maternal blood levels of the amino acid homocysteine (Hcy) and fetal brain formation impairments, as well as cognitive deficits in offspring, the role of brain plasticity in the development of these pathologies is still insufficiently studied. This review allows to be acquainted with the available data on the negative impact of hyperhomocysteinemia (HHcy) on the neural plasticity. An important aspect of the problem considered in the review is the possible influence of maternal HHcy on the offspring brain plasticity through the epigenetic mechanisms. Data on changes in intracellular methylation potential, activity of DNA methyltransferases, and DNA methylation in brain cells under the influence of HHcy are presented, and possible effects of HHcy on histone modifications and microRNA expression are considered. Since placenta plays a key role in the transport of nutrients and modulation of signals from mother to fetus, its dysfunction due to epigenetic mechanisms disturbances may affect the development of the fetal CNS. In this regard, the review presents data on the impact of maternal HHcy on the epigenetic regulation in the placenta. The data presented in the review are not only of theoretical significance, but are also of interest for understanding the role of epigenetic mechanisms in the pathogenesis of diseases for which HHcy is a risk factor (pregnancy pathologies accompanied by delayed fetal brain development, cognitive impairments in childhood and neuropsychiatric and neurodegenerative disorders later in life), as well as the search for approaches to their prevention using neuroprotectors.

Keywords: maternal (prenatal) hyperhomocysteinemia, epigenetic regulation, fetus, newborn, brain, placenta, neuronal plasticity

НЕЙРОНАЛЬНЫЕ ЭКЗОСОМЫ КАК НОВАЯ СИСТЕМА СИГНАЛИНГА

Обзор

© 2023 А.А. Яковлев^{1,2}

¹ *Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
117485 Москва, Россия; электронная почта: al_yakovlev@ihna.ru*

² *Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева,
Департамент здравоохранения Москвы, 115419 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 07.11.2022

После доработки 01.03.2023

Принята к публикации 03.03.2023

С каждым годом изучению нейрональных экзосом посвящается все больше и больше работ. Существенно исследован потенциал экзосом как диагностических маркеров для нейродегенеративных заболеваний, и похожие схемы поиска маркеров заимствованы для исследования психиатрических патологий. Выяснены основы биогенеза экзосом в разных типах клеток, активно идет исследование физиологического значения экзосом, проясняются многие аспекты сигналинга с их участием. При этом накоплены данные, указывающие на роль экзосомального сигналинга как на важный элемент межнейрональной коммуникации. Достаточно ли у нас оснований, чтобы назвать экзосомы новым неканоническим нейротрансммиттером в головном мозге? Ответу на этот вопрос посвящена данная дискуссионная работа, в которой автор представляет на суд научной общественности концепцию о возможной роли экзосом мозга как сигнальной системы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: экзосомы, экстраклеточные везикулы, нейроны, деполяризация, кальций, малые ГТФазы Rab, комплекс SNARE.

DOI: 10.31857/S0320972523040024, **EDN:** AKCJBZ

ВВЕДЕНИЕ

Под термином «экстраклеточные везикулы» понимаются любые секретируемые клеткой в экстраклеточное пространство мембранные везикулы [1]. Экстраклеточные везикулы принято классифицировать на три основные группы в зависимости от механизма их образования. Экзосомы имеют размер 50–150 нм и являются продуктом эндолизосомальной системы. Микровезикулы (100–1000 нм), иначе называемые микрочастицы или эктосомы, являются результатом отшнуровывания мембранных везикул непосредственно от плазматической мембраны. Апоптотические тельца (400–4000 нм) являются остатками клеток, погибших в результате апоптоза. Между экзосомами, микровезикулами и апоптотическими тельцами могут быть как сходства, так и различия по внутривезикулярному составу [2]. Зачастую истинное происхождение экстраклеточных везикул неизвестно или даже не может быть установлено, в таком случае при-

нято говорить о размере и/или плотности везикул, не вдаваясь в подробности. Например, вполне допустимо говорить о малых экстраклеточных везикулах только на основании размера (до 200 нм) вне зависимости от природы везикулы.

Экзосомы характеризуются несколькими характерными белковыми маркерами. Это тетраспанины (CD81, CD9, CD63) и характерные мембранные белки эндолизосомальной системы (например, Alix, TSG101, HSC 70). Список маркеров экзосом постоянно пополняется по мере появления новых экспериментальных данных, но актуальное положение дел всегда можно найти в общедоступных базах данных, например на www.exocarta.org. Экзосомы образуются в результате отшнуровывания везикул с цитоплазматическим содержанием внутрь поздних эндосом. Собственно, после слияния образованного этим способом мультивезикулярного тельца с плазматической мембраной содержащиеся в нем интралюминальные везикулы становятся экзосомами.

В настоящее время принято считать, что таким способом клетка не только избавляется от ненужных внутриклеточных компонентов, но и обменивается информацией с другими клетками организма. Последнему обстоятельству с каждым годом находится все больше и больше подтверждений, так что в некотором смысле можно говорить об экзосомальной системе сигналинга [3]. За многие годы изучения не было обнаружено клеток, не способных к секреции экзосом, так что, видимо, стоит заключить, что все клетки секретируют экзосомы. В частности, в нервной системе нейроны, олигодендроциты, астроциты и микроглия секретируют экзосомы, передающие информацию как между клетками мозга, так и за гематоэнцефалический барьер [4, 5]. Характерной особенностью экзосом является их стабильность. Отчасти эта стабильность объясняется наличием сигнала «свой/не ешь меня» на мембране экзосом, что защищает от поглощения экзосом фагоцитирующими клетками.

Экзосомы обнаружены во всех исследованных биологических жидкостях, среди которых есть и кровь, и цереброспинальная жидкость. Экзосомы содержат все характерные типы биологических макромолекул: белки, липиды и нуклеиновые кислоты. Кроме того, в экзосомах переносятся некоторые метаболиты. Согласно базам данных, в экзосомах человеческих клеток разных типов к настоящему времени было идентифицировано что-то около 6000 белков, сотни микроРНК и сотни липидов.

С каждым годом растет интерес к исследованию экзосом при нейродегенеративных заболеваниях. В первую очередь работы посвящены поиску экзосомальных маркеров для диагностики ранних стадий нейродегенерации, но также и выяснению роли экзосом в распространении нейродегенеративной патологии и возможному применению экзосом в терапии [6–8]. Еще раз стоит отметить, что в реальных экспериментах не всегда удается выяснить биогенез исследуемых экстраклеточных везикул, поэтому сказанное про экзосомы, наверное, в некоторой степени может относиться не к экзосомам, а, например, к микровезикулам. Четких маркеров, позволяющих однозначно разделить разные типы везикул, пока не существует. Тем не менее, опираясь на совокупность приведенных в публикациях характеристик везикул (размер, плотность, наличие маркеров белковой природы), можно полагать, что основная масса работ все же имеет дело с экзосомами.

В настоящее время идет интенсивный поиск экзосомальных маркеров самых ран-

них стадий нейродегенеративных заболеваний, а также маркеров, позволяющих следить за прогрессированием заболеваний. Высокий потенциал экзосом как диагностического инструмента для нейродегенеративных заболеваний определяется несколькими причинами. Первое, состав экзосом изменяется с течением заболевания. Второе, экзосомы проникают через гематоэнцефалический барьер, причем в обоих направлениях. Третье, существование методов выделения экзосом мозга в крови, основанных на поверхностных маркерах экзосом [6, 9, 10]. Специфичными маркерами экзосом нейронов являются белки клеточной адгезии L1CAM (он же CD171) и NCAM, а также субъединицы GluR2/3 AMPA-рецептора глутамата [11]. Транспортёр возбуждающих аминокислот EAAT-1 (он же GLAST) специфически содержится на экзосомах астроцитов [12]. Олигодендроглиальные экзосомы специфически характеризуются протеолипидным белком миелина (PLP) и олигодендроцитарным гликопротеином миелина (MOG) [13].

СЕКРЕЦИЯ ЭКЗОСОМ НЕЙРОНАМИ

Секреция экзосом нейронами головного мозга была показана на нескольких моделях нейронов в культуре. В культуре первичных кортикальных нейронов (E19 DIV9) можно видеть секрецию экзосом [11]. На базальном уровне секреция экзосом нейронами происходит постоянно, и нейрональные экзосомы содержат как белки, характерные для экзосом из других типов клеток, так и белки, специфичные для нейронов. Среди общих экзосомальных белков идентифицированы актин, тубулин, клатрин, Alix, TSG101, HSC 70 и некоторые другие, ожидаемые, широко распространенные экзосомальные белки из самых разных типов клеток. Идентифицированы и отличительные белки нейрональных экзосом – это белок клеточной адгезии L1, он же CD171, субъединицы GluR2 и GluR3 AMPA-рецептора глутамата, специфичная для мозга форма церулоплазмينا и прионный белок PrPc [11]. Самой важной находкой ранних исследований экзосомального сигналинга в нейронах стало открытие драматического влияния деполяризации на секрецию экзосом нейронами в культуре. Деполяризация является абсолютно необходимой составляющей функционирования нейронов и совершенно точно отличает нейроны от подавляющего большинства клеток других типов. И деполяризация

вызывает многократное усиление и секреции экзосом, и секреции GluR2/3-субъединиц AMPA-рецептора глутамата в составе экзосом [11]. Заметна гетерогенность экзосом, секретиремых нейронами в культуре, по плотности, по размеру, по представленным в составе экзосом антигенам. Этому факту стоит отдельно уделить несколько строк. Дело в том, что представленные в крови экзосомы характеризуются большой гетерогенностью практически по всем своим характеристикам [14]. Оказывается, что даже очень похожие друг на друга клетки одного типа секретируют экзосомы, различающиеся по многим своим основным характеристикам. Причины такой гетерогенности пока не известны.

Деполаризация в нейронах вызывает сильное увеличение концентрации внутриклеточного кальция. Судя по всему, именно кальций является индуктором секреции экзосом как в нейронах, так и в других клетках [15–18]. Можно попробовать ответить на вопрос, почему при деполаризации происходит усиление секреции экзосом нейронами. Продолжительная деполаризация является признаком длительной активности нейрона. Может быть, секреция в экзосомах субъединиц глутаматного рецептора призвана избавить нейрон от дальнейшей деполаризации? Хорошо известно, что длительное повышение концентрации кальция в нейроне может привести к его гибели [19–24]. Известны основные эффекторы кальция в клетке и основные схемы, приводящие к гибели клетки после повышения концентрации кальция [19, 20]. С этой точки зрения, избавление от глутаматных рецепторов посредством их секреции в составе экзосом предотвращает дальнейшее повышение концентрации внутриклеточного кальция и является для нейрона защитной стратегией. Дополнительной убедительности этому предположению придадут особенности строения нейрона. А именно, синапсы лишены лизосом и, соответственно, избавиться от рецепторов путем их деградации локально в синапсе нейроны не способны, тогда как мультивезикулярные тела есть и в аксонах, и в дендритах [25]. Таким образом, структура в очередной раз может подсказать функцию. Синапс, лишенный лизосом, может избавляться от рецепторов посредством их секреции с помощью мультивезикулярных телец. С другой стороны, секреция в составе экзосом NR1-субъединицы NMDA-рецептора глутамата не происходит ни на базальном уровне, ни при деполаризации нейронов [11]. Естественно, этот факт не опровергает предположение, выдвинутое в работе Fauré et al. [11]

о защитном избавлении нейронов от некоторых рецепторов с помощью экзосом, но делает интерпретацию не столь однозначной. В такой парадигме совершенно неясно, зачем же вместе с глутаматными рецепторами нейрон избавляется, например, от церуллоплазмина и PrP^c. Таким образом, предположение об экзосомах, как о средстве избавления от ненужных рецепторов, вполне имеет право на существование, но, судя по всему, точно не является единственной возможной интерпретацией.

Вообще, сокращение (как и увеличение) числа AMPA-рецепторов в синапсе является большой частью физиологии нейрона. Самыми исследованными примерами вовлечения AMPA-рецептора в работу нейрона являются долговременная депрессия и долговременная потенциация [26]. Считается, что увеличение числа AMPA-рецепторов в синапсе приводит к долговременной потенциации, а уменьшение их числа – к долговременной депрессии [27]. Известно, что синаптическая активность приводит к интернализации GluR2- и GluR3-, но не GluR1-субъединиц AMPA-рецептора [28]. В самых ранних экспериментальных работах по этой теме было показано, что GluR2-субъединица AMPA-рецептора, интернализованная в нейроне, колокализует с мембранным белком LAMP1, и совершенно логично был сделан вывод, что GluR2 в этой ситуации расщепляется в лизосомах [28]. В настоящее время известно, что LAMP1 является не только маркером лизосомальной мембраны, но также и секретирруется в составе экзосом [29]. Таким образом, при физиологических состояниях, таких как продолжительная синаптическая активность, субъединицы AMPA-рецептора интернализуются внутрь клетки, а затем могут быть секретированы в составе экзосом [11].

На модели первичных нейронов в культуре (E19 DIV15) результаты подтверждают все предыдущие находки [30]. А именно, деполаризация вызывает существенное (в 5–10 раз) усиление секреции экзосом нейронами. В составе экзосом в этой ситуации также обнаружены GluR2- и GluR3-субъединицы AMPA-рецептора. Повышение концентрации внутриклеточного кальция с помощью ионофора вызывает секрецию экзосом, а кальциевый хелатор предотвращает секрецию. С помощью электронной микроскопии установлено, что секреция происходит из соматодендритного компартмента нейронов. Если усиление синаптической активности вызывает секрецию экзосом, то ее угнетение предотвращает секрецию, при том что увеличение секреции экзосом зависит

от активности и AMPA-, и NMDA-рецепторов. Все эти обстоятельства указывают на то, что секреция экзосом является частью нормальной физиологии нейрона.

К настоящему времени секреция экзосом показана для нейронов на разных стадиях созревания в культуре (от DIV3 до DIV15) [11, 30, 31]. Довольно неожиданно, в модели на нейронах, полученных при индукции плюрипотентных стволовых клеток, деполяризация не вызывает увеличения секреции экзосом, при этом авторы предполагают существенное различие в условиях проведения экспериментов [32]. При этом очевидно, что первичные нейроны в культуре в существенной степени отличаются от дифференцированных в нейрональный фенотип стволовых клеток, но какой (-ие) конкретно фактор (-ы) определяет (-ют) различие в характере секреции экзосом при деполяризации, остается неизвестным.

Секреция экзосом показана не только из постсинаптического компартмента. В простой модели *in vitro* на синапсосомах коры головного мозга мыши показана секреция экзосом из пресинаптического компартмента [33]. Синапсосомы представляют собой экспериментальный объект, в живом мозге не существующий, это замкнутые окончания аксонов, полученные при гомогенизации головного мозга. Несмотря на несколько искусственную природу, синапсосомы зарекомендовали себя как полезный экспериментальный объект, с помощью которого можно моделировать довольно сложные физиологические процессы, например, выброс медиатора в ответ на деполяризацию [34]. По крайней мере, синапсосомы содержат все характерные пресинаптические структуры, необходимые для работы реального синапса, а также ферменты и сигнальные белки, необходимые для синаптических процессов [33]. Оказывается, синапсосомы также содержат белки, являющиеся маркерами экзосом (TSG101, флотиллин-1, CD9, CD63) [33]. Видимо, следует сделать вывод, что в норме экзосомы содержатся в окончаниях аксонов нейронов коры головного мозга [33]. Эти данные подтверждаются электронной микроскопией [33]. Высвобождение экзосом из синапсосом происходит в базальных условиях и усиливается под действием деполяризующего стимула [33]. При этом, по данным электронной микроскопии, происходит истощение синапсосомального пула мультивезикулярных телец. Ключевым для стимуляции секреции является наличие в среде кальция, как и для других экспериментов по экзосомальной секреции [33]. Этот факт наводит на мысль, что

секреция экзосом из пресинаптических терминалей является активным физиологическим процессом.

Кальций принципиально важен для синаптической передачи. В частности, высвобождение нейромедиатора зависит от повышения концентрации кальция в пресинапсе [35]. Если и секреция экзосом из пресинапса зависит от кальция, то мы должны видеть одновременную секрецию и экзосом, и нейромедиатора при повышении концентрации кальция. Так в действительности и происходит [33]. Через несколько минут после деполяризации синапсосом из коры головного мозга мышей в кальцийсодержащей среде происходит и секреция экзосом, и секреция основного возбуждающего медиатора этих клеток – глутамата. Важное различие между этими двумя процессами заключается в их чувствительности к регуляторным синаптическим механизмам. При деполяризации на фоне кальция агонисты пресинаптических ГАМК-рецепторов предотвращают высвобождение глутамата из синапсосом, тогда как секреция экзосом в этих условиях не меняется [33]. Механизм такого различия между двумя кальций-зависимыми процессами еще предстоит выяснить.

Нейроны – не единственные клетки мозга, которые обмениваются информацией между собой с помощью экзосом. Под действием кальция происходит секреция экзосом из олигодендроцитов [13]. Повышение кальция в олигодендроцитах происходит в ответ на секрецию глутамата нейронами, а секретированные олигодендроглиальные экзосомы поглощаются нейронами [15]. Нейроны в культуре секретируют ростовые факторы VEGF и FGF-2 в составе экстраклеточных везикул [36]. Эти факторы являются индукторами роста эндотелиальных клеток. Деполяризация приводит к секреции экзосом из нейритного компартмента клетки [37]. Секретируемые экзосомы обогащены микроРНК, специфичными для мозга. Также эти экзосомы содержат белки, специфичные для дендритного компартмента клетки. Экспрессия астроглиального транспортера глутамата GLT-1 (иначе называемого EAAT2) индуцируется такими нейрональными экзосомами [38]. Высвобождение экзосом усиливается при деполяризации нейронов. Экзосомы поглощаются селективно глиальными клетками, при этом хорошо известно, что астроглиальный белок GLT-1 играет основную роль в удалении экстраклеточного глутамата.

Клетки смешанной культуры гиппокампальных клеток (нейроны и астроглия) проявляют избирательность в поглощении

секретированных кортикальными нейронами экзосом [39]. Экзосомы кортикальных нейронов были предусмотрительно помечены GFP, после чего количественный анализ поглощения экзосом клетками стал легко решаемой задачей. Оказалось, что экзосомы кортикальных нейронов колокализуются только в MAP2-позитивных клетках, то есть в нейронах, и ни в каких других [39]. Специально было показано, что с GFAP-позитивными клетками, то есть астроглией, экзосомы кортикальных нейронов не колокализуются, видимо не взаимодействуют. Электронная микроскопия подтверждает, что экзосомы связываются с поверхностью нейронов, при этом важно отметить, что не каждый нейрон, и не вся поверхность нейрона принимают участие во взаимодействии с экзосомами. Конкретными участками связывания экзосом с поверхностью нейронов оказались пресинаптические сайты (синаптофизин-позитивные), расположенные напротив постсинаптических сайтов (PSD95-позитивных), хотя экзосомы и связывались далеко не с каждым таким сайтом. Отдельно было показано, что экзосомы из культуральной жидкости клеток нейробластомы неселективно связываются с клетками в гиппокампальной культуре, не проявляя предпочтения ни к нейронам, ни к астроглии, более-менее равномерно взаимодействуя с поверхностью клеток без какого-либо предпочтения в участках связывания [39]. В какой степени эта находка в эксперименте на культуре клеток приложима к функционирующему мозгу, остается неизвестным, но если мы вправе проводить аналогию, то можем сказать, что нейрональные экзосомы специфически связываются с пресинаптическими терминалями нейронов, но не с астроглиальными клетками.

Синапсы содержат как морфологические структуры, необходимые для секреции экзосом [24], так и белки, необходимые для биогенеза экзосом [40]. Важным структурным и функциональным компонентом для биогенеза экзосом является белок Alix, представленный в синапсах [41]. В нейронах коры головного мозга крысы Alix накапливается в пресинапсе по мере созревания этих клеток, и, более того, концентрация Alix в пресинапсе возрастает двукратно после стимуляции (деполяризация бикаулином/4-аминопиридином) зрелых нейронов (DIV15). Этот процесс зависит от концентрации кальция. Флуоресцентно меченный Alix в норме распределен более-менее равномерно по цитоплазме, но уже после двух минут деполяризации Alix концентрируется в работающих (секретирующих нейромедиатор) преси-

напсах. Всего Alix обнаруживается примерно в 80% работающих пресинапсов, но практически не обнаруживается в постсинапсах, по колокализации с синапсином и PSD95 соответственно [41]. На срезах из мозга мышей, не экспрессирующих Alix, гораздо хуже вырабатывается долговременная потенция, вероятно, из-за сниженной площади синаптических контактов. Насколько Alix важен для секреции экзосом из пресинапса, и чем важны эти экзосомы для работы нейрона, остается пока невыясненным.

АППАРАТ СЕКРЕЦИИ

Хорошо известно, что регулируемая секреция в клетках происходит при участии белков семейства SNARE. Это семейство представлено десятками гомологичных белков эукариотических организмов, от дрожжей до человека. Механизм участия белков SNARE в секреции везикул заключается в узнавании друг друга представителем этого семейства, локализованным на мембране везикулы (*v*-SNARE) и представителем этого же семейства, заякоренным внутри клетки на плазматической мембране (*t*-SNARE). Взаимодействие *v*-SNARE и *t*-SNARE приводит к заякориванию везикулы в плазматической мембране, слиянию мембран и секреции содержимого везикулы во внеклеточное пространство. В том, что белки семейства SNARE необходимы для регулируемой секреции, убеждают результаты генетических исследований. У дрожжей нокаут по некоторым из генов, кодирующих белки SNARE, летален, а подавление экспрессии белков SNARE у дрозофилы, нематоды или мыши подавляет и нейротрансмиссию, и секрецию в ненейрональных клетках [42–46]. Конечно, не все представители семейства SNARE в одинаковой степени необходимы для регулируемой секреции, но в целом хотя бы несколько представителей семейства SNARE обязательно являются необходимым звеном механизма секреции в конкретной клетке.

Еще одним необходимым звеном регулируемой секреции является внутриклеточный направленный трафик везикул. За этот процесс в клетке отвечают белки семейства Rab. Это представители малых ГТФаз, причем их наиболее представленная группа – в геноме эукариот. Направление трафика везикулы внутри клетки зависит от того, какой из белков Rab локализован на мембране этой везикулы, например, Rab3 на мембране везикулы приводит к ее секреции, а Rab7 приведет везикулу

в лизосому [47]. Нарушение работы белков семейства Rab нарушает экзоцитоз в клетках самых разных типов различных организмов [48–53]. Белки семейства Rab столь же незаменимы в регулируемой секреции везикул, как и представители SNARE, выполняя функции сортировщиков везикул разного генеза внутри клетки.

Имея в виду универсальное вовлечение белков Rab и SNARE в трафик и секрецию везикул, неудивительно будет узнать, что и механизм слияния мультивезикулярного тельца с плазматической мембраной включает в себя взаимодействие белков SNARE и зависит от активности малых ГТФаз семейства Rab, то есть происходит по хорошо известному сценарию регулируемой секреции [54–56]. Несмотря на то что хорошие доказательства участия именно этих механизмов в секреции мультивезикулярных телец получены на ненейрональных клетках, по большому счету, нет сомнений, что у нейронов процесс происходит в общем-то также. Вероятно, только такой вариант и можно предполагать, зная сколь универсальны системы Rab и SNARE в секреции везикул, так что зависимость от Rab и SNARE секреция экзосом лишь подтверждает универсальность такого сценария.

ПОПЫТКА ОБОБЩЕНИЯ

Для дальнейших обобщений полезно будет отталкиваться от нескольких формальных определений, прекрасно изложенных в настольной книге нейробиолога, «Basic Neurochemistry» [57]. Классическое определение нейромедиатора включает три положения. Нейромедиатор должен быть в составе везикул, должен высвободиться в ответ на повышение внутриклеточной концентрации кальция, и его экзогенная аппликация должна производить тот же эффект, что и высвобождение в физиологическом процессе. Нетрудно заметить, что экзосомы формально попадают под определение нейромедиатора.

Конститутивная секреция является общей особенностью всех эукариотических клеток. Если секреторная везикула сливается с плазматической мембраной, высвобождая содержимое без внешнего стимула, то этот процесс и будет называться конститутивной секрецией или неспецифическим экзоцитозом. Регулируемая секреция отличима от конститутивной секреции в силу двух с половиной основных обстоятельств. Первое, регулируемая секреция зависит от экстраклеточного стимула, который приводит к ограниченному по времени

и в пространстве повышению концентрации ионов кальция, что, в свою очередь, приводит к слиянию мембраны секреторной везикулы с плазматической мембраной и секреции содержимого везикулы во внеклеточное пространство. Второе, в секреторных везикулах должен содержаться секреторируемый продукт в концентрированном виде, а самих везикул должно быть много. И последнее, секреторные везикулы, как правило, хранятся в виде некоторого запаса вблизи мест высвобождения, это обстоятельство может и не наблюдаться, например, в результате длительной активности и расходованию запаса секреторных везикул.

Если речь идет о привычной синаптической секреции нейромедиатора, то под секреторной везикулой подразумевается синаптическая везикула, а в случае экзосомального сигналинга секреторной везикулой является мультивезикулярное тельце. Таким образом, для того чтобы секрецию можно было назвать регулируемой, клетки (нейроны) должны синтезировать, упаковывать и хранить специальные секреторные везикулы, а также быстро высвобождать их после специфической для данной клетки физиологической стимуляции.

Таким образом, выше изложены и на рисунке представлены все формальные обстоятельства, на основании которых секреция экзосом нейронами является регулируемой секрецией, а сами экзосомы являются нейромедиаторами. Данный факт ни в коем случае не является ни новой экспериментальной находкой, ни плодом расшифровки сложноинтерпретируемых результатов. Скорее, речь идет о полезном для дальнейшего развития области давно назревшем обобщении. Взгляд на секрецию экзосом, как на избавление клетки от ненужных белков, устаревал постепенно, начиная с момента появления, и сейчас экзосомы – часть богатой области межклеточной коммуникации вместе с нейротрансмиттерами и гормонами [3]. Но место экзосом в межклеточной коммуникации пока выглядит неопределенным, поэтому сейчас самое время попытаться сформулировать новый взгляд на экзосомный сигналинг. А именно, экзосомы представляют собой новый неканонический нейротрансмиттер в головном мозге. Но к чему этот маневр – назвать давно известную вещь новым именем? Смысл такого переименования в том, чтобы начать поиск эффекторов экзосом в мозге по аналогии с классическими нейротрансмиттерами. Принципиальной можно считать лишь разницу в размерах, так как все классические нейротрансмиттеры имеют характерную молекулярную массу 0,5–50 кДа,

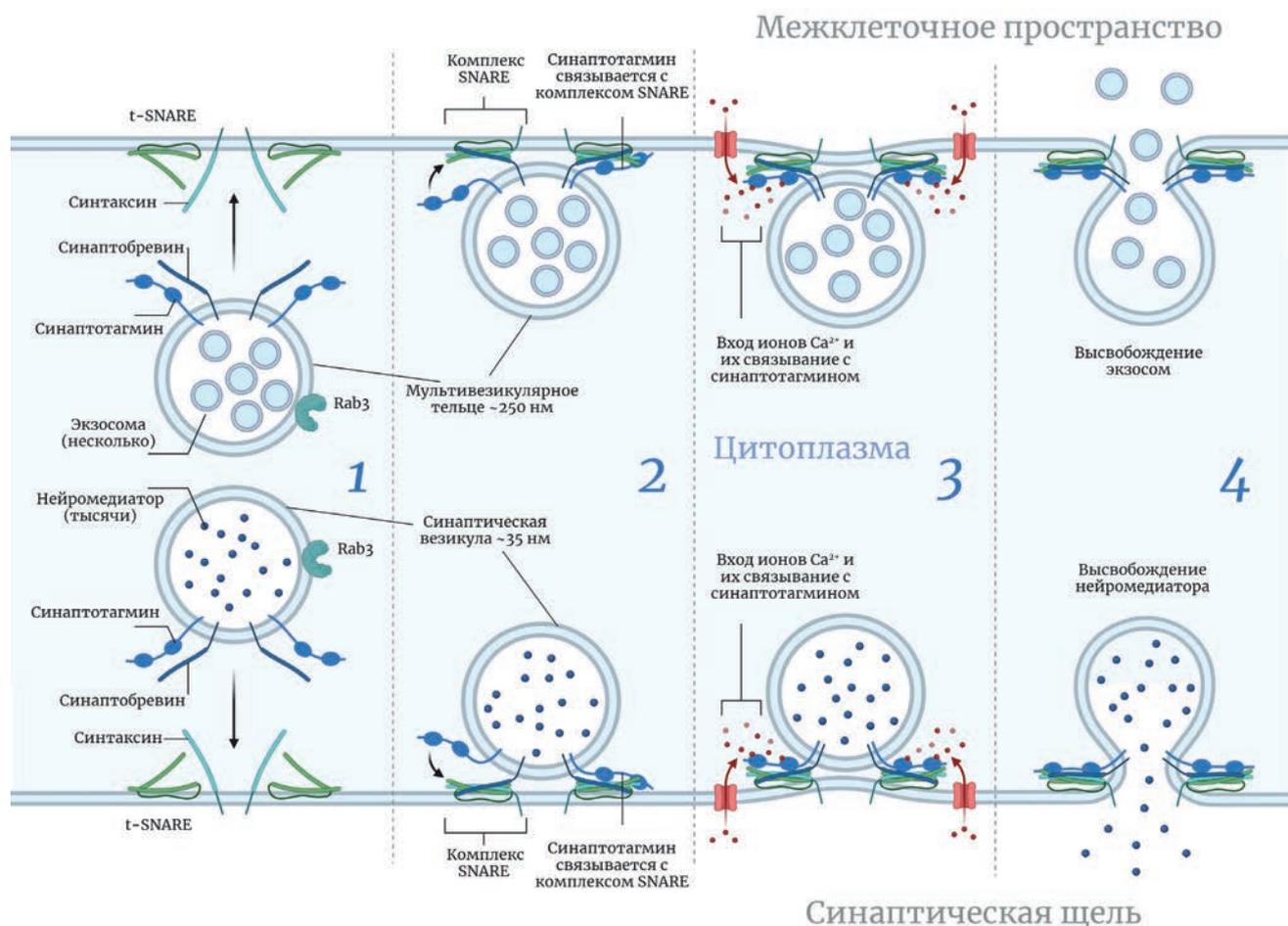


Иллюстрация процессов, происходящих в пресинаптическом компартменте, подчеркивающая параллели между секрецией нейромедиатора и секрецией экзосом. 1 – В неактивном состоянии в пресинапсе находятся загруженные нейромедиатором синаптические пузырьки и загруженные интралюменальными везикулами мультивезикулярные тельца. 2 – Подготовленное к секреции состояние синаптических пузырьков и мультивезикулярных телец (характерная при- мембранная локализация). 3 – Вход ионов кальция в клетку запускает каскад секреции. 4 – Слияние внутриклеточных компартментов с плазматической мембраной и высвобождение их содержимого во внеклеточное пространство

а экзосомы, конечно, значительно больше – десятки МДа. Но при этом многие системы сигналинга экзосом могут быть похожи на сигналинг нейротрансмиттеров – от вызываемого изменения концентрации ионов до феноменов долговременной потенциации сигнала. По крайней мере, характерные структурно-функциональные особенности экзосом мозга позволяют предположить именно это.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-20112).

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., Beckham, C., Bedina Zavec, A., Benmoussa, A., Berardi, A. C., Bergese, P., Bielska, E., Blenkiron, C., Bobis-Wozowicz, S., Boilard, E., Boireau, W., Bongiovanni, A., Borràs, F. E., Bosch, S., Boulanger, C. M., Breakefield, X., Breglio, A. M., Brennan, M. Á., Brigstock, D. R., Brisson, A., Broekman, M. L., Bromberg, J. F., Bryl-Górecka, P., Buch, S., Buck, A. H., Burger, D., Busatto, S., Buschmann, D., Bussolati, B., Buzás, E. I., Byrd, J. B., Camussi, G.,

- Carter, D. R., Caruso, S., Chamley, L. W., Chang, Y. T., Chen, C., Chen, S., Cheng, L., Chin, A. R., Clayton, A., Clerici, S. P., Cocks, A., Cocucci, E., Coffey, R. J., Cordeiro-da-Silva, A., Couch, Y., Coumans, F. A., Coyle, B., Crescitelli, R., Criado, M. F., D'Souza-Schorey, C., Das, S., Datta Chaudhuri, A., de Candia, P., De Santana, E. F., De Wever, O., Del Portillo, H. A., Demaret, T., Deville, S., Devitt, A., Dhondt, B., Di Vizio, D., Dieterich, L. C., Dolo, V., Dominguez Rubio, A. P., Dominici, M., Dourado, M. R., Driedonks, T. A., Duarte, F. V., Duncan, H. M., Eichenberger, R. M., Ekström, K., El Andaloussi, S., Elie-Caille, C., Erdbrügger, U., Falcón-Pérez, J. M., Fatima, F., Fish, J. E., Flores-Bellver, M., Försönits, A., Frelet-Barrand, A., Fricke, F., Fuhrmann, G., Gabrielsson, S., Gámez-Valero, A., Gardiner, C., Gärtner, K., Gaudin, R., Gho, Y. S., Giebel, B., Gilbert, C., Gimona, M., Giusti, I., Goberdhan, D. C., Görgens, A., Gorski, S. M., Greening, D. W., Gross, J. C., Gualerzi, A., Gupta, G. N., Gustafson, D., Handberg, A., Haraszi, R. A., Harrison, P., Hegyesi, H., Hendrix, A., Hill, A. F., Hochberg, F. H., Hoffmann, K. F., Holder, B., Holthofer, H., Hosseinkhani, B., Hu, G., Huang, Y., Huber, V., Hunt, S., Ibrahim, A. G., Ikezu, T., Inal, J. M., Isin, M., Ivanova, A., Jackson, H. K., Jacobsen, S., Jay, S. M., Jayachandran, M., Jenster, G., Jiang, L., Johnson, S. M., Jones, J. C., Jong, A., Jovanovic-Taliman, T., Jung, S., Kalluri, R., Kano, S. I., Kaur, S., Kawamura, Y., Keller, E. T., Khamari, D., Khomyakova, E., Khvorova, A., Kierulf, P., Kim, K. P., Kislinger, T., Klingeborn, M., Klinke, D. J. 2nd, Kornek, M., Kosanović, M. M., Kovács, Á. F., Krämer-Albers, E. M., Krasemann, S., Krause, M., Kurochkin, I. V., Kusuma, G. D., Kuypers, S., Laitinen, S., Langevin, S. M., Languino, L. R., Lannigan, J., Lässer, C., Laurent, L. C., Lavieu, G., Lázaro-Ibáñez, E., Le Lay, S., Lee, M. S., Lee, Y. X. F., Lemos, D. S., Lenassi, M., Leszczynska, A., Li, I. T., Liao, K., Libregts, S. F., Ligeti, E., Lim, R., Lim, S. K., Linē, A., Linnemannstōns, K., Llorente, A., Lombard, C. A., Lorenowicz, M. J., Lőrincz, Á. M., Lötvall, J., Lovett, J., Lowry, M. C., Loyer, X., Lu, Q., Lukomska, B., Lunavat, T. R., Maas, S. L., Malhi, H., Marcilla, A., Mariani, J., Mariscal, J., Martens-Uzunova, E. S., Martin-Jaular, L., Martinez, M. C., Martins, V. R., Mathieu, M., Mathivanan, S., Maugeri, M., McGinnis, L. K., McVey, M. J., Meckes, D. G. Jr., Meehan, K. L., Mertens, I., Minciacchi, V. R., Möller, A., Möller Jørgensen, M., Morales-Kastresana, A., Morhayim, J., Mullier, F., Muraca, M., Musante, L., Mussack, V., Muth, D. C., Myburgh, K. H., Najrana, T., Nawaz, M., Nazarenko, I., Nejsum, P., Neri, C., Neri, T., Nieuwland, R., Nimrichter, L., Nolan, J. P., Nolte-'t, Hoen, E. N., Noren Hooten, N., O'Driscoll, L., O'Grady, T., O'Loghlen, A., Ochiya, T., Olivier, M., Ortiz, A., Ortiz, L. A., Osteikoetxea, X., Østergaard, O., Ostrowski, M., Park, J., Pegtel, D. M., Peinado, H., Perut, F., Pfaffl, M. W., Phinney, D. G., Pieters, B. C., Pink, R. C., Pisetsky, D. S., Pogge von Strandmann, E., Polakovicova, I., Poon, I. K., Powell, B. H., Prada, I., Pulliam, L., Quesenberry, P., Radeghieri, A., Raffai, R. L., Raimondo, S., Rak, J., Ramirez, M. I., Raposo, G., Rayyan, M. S., Regev-Rudzki, N., Ricklefs, F. L., Robbins, P. D., Roberts, D. D., Rodrigues, S. C., Rohde, E., Rome, S., Rouschop, K. M., Rugghetti, A., Russell, A. E., Saá, P., Sahoo, S., Salas-Huenuleo, E., Sánchez, C., Saugstad, J. A., Saul, M. J., Schiffelers, R. M., Schneider, R., Schøyen, T. H., Scott, A., Shahaj, E., Sharma, S., Shatnyeva, O., Shekari, F., Shelke, G. V., Shetty, A. K., Shiba, K., Siljander, P. R., Silva, A. M., Skowronek, A., Snyder, O. L. 2nd., Soares, R. P., Sódar, B. W., Soekmadji, C., Sotillo, J., Stahl, P. D., Stoorvogel, W., Stott, S. L., Strasser, E. F., Swift, S., Tahara, H., Tewari, M., Timms, K., Tiwari, S., Tixeira, R., Tkach, M., Toh, W. S., Tomasini, R., Torrecilhas, A. C., Tosar, J. P., Toxavidis, V., Urbanelli, L., Vader, P., van Balkom, B. W., van der Grein, S. G., Van Deun, J., van Herwijnen, M. J., Van Keuren-Jensen, K., van Niel, G., van Royen, M. E., van Wijnen, A. J., Vasconcelos, M. H., Vechetti, I. J. Jr., Veit, T. D., Vella, L. J., Velot, É., Verweij, F. J., Vestad, B., Viñas, J. L., Visnovitz, T., Vukman, K. V., Wahlgren, J., Watson, D. C., Wauben, M. H., Weaver, A., Webber, J. P., Weber, V., Wehman, A. M., Weiss, D. J., Welsh, J. A., Wendt, S., Wheelock, A. M., Wiener, Z., Witte, L., Wolfram, J., Xagorari, A., Xander, P., Xu, J., Yan, X., Yáñez-Mó, M., Yin, H., Yuana, Y., Zappulli, V., Zarubova, J., Žekas, V., Zhang, J. Y., Zhao, Z., Zheng, L., Zheutlin, A. R., Zickler, A. M., Zimmermann, P., Zivkovic, A. M., Zocco, D., and Zuba-Surma, E. K. (2018) Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines, *J. Extracell. Vesicles*, **7**, 1535750, doi: 10.1080/20013078.2018.1535750.
2. Kalluri, R., and LeBleu, V. S. (2020) The biology, function, and biomedical applications of exosomes, *Science*, **367**, doi: 10.1126/science.aau6977.
 3. Van Niel, G., Carter, D. R. F., Clayton, A., Lambert, D. W., Raposo, G., and Vader, P. (2022) Challenges and directions in studying cell-cell communication by extracellular vesicles, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **23**, 369-382, doi: 10.1038/s41580-022-00460-3.
 4. Khaspeckov, L. G., and Yakovlev, A. A. (2023) Perspectives for the use of small extracellular vesicles as a transport vehicle through the blood-brain barrier, *Neurochem. J.*, **39**, 1-18.
 5. Yakovlev, A. A. (2022) Neuroprotective effects of astrocyte extracellular vesicles in stroke, *Neurochem. J.*, **16**, 121-129, doi: 10.1134/s1819712422020143.

6. Jia, L., Zhu, M., Kong, C., Pang, Y., Zhang, H., Qiu, Q., Wei, C., Tang, Y., Wang, Q., Li, Y., Li, T., Li, F., Wang, Q., Li, Y., Wei, Y., and Jia, J. (2021) Blood neuro-exosomal synaptic proteins predict Alzheimer's disease at the asymptomatic stage, *Alzheimer's Dement.*, **17**, 49-60, doi: 10.1002/alz.12166.
7. Wang, Y., Balaji, V., Kaniyappan, S., Krüger, L., Irsen, S., Tepper, K., Chandupatla, R., Maetzler, W., Schneider, A., Mandelkow, E., and Mandelkow, E. M. (2017) The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes, *Mol. Neurodegener.*, **12**, 5, doi: 10.1186/s13024-016-0143-y.
8. Xin, H., Li, Y., Cui, Y., Yang, J. J., Zhang, Z. G., and Chopp, M. (2013) Systemic administration of exosomes released from mesenchymal stromal cells promote functional recovery and neurovascular plasticity after stroke in rats, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **33**, 1711-1715, doi: 10.1038/jcbfm.2013.152.
9. Goetzl, E. J., Kapogiannis, D., Schwartz, J. B., Lobach, I. V., Goetzl, L., Abner, E. L., Jicha, G. A., Karydas, A. M., Boxer, A., and Miller, B. L. (2016) Decreased synaptic proteins in neuronal exosomes of frontotemporal dementia and Alzheimer's disease, *FASEB J.*, **30**, 4141-4148, doi: 10.1096/fj.201600816R.
10. Winston, C. N., Goetzl, E. J., Akers, J. C., Carter, B. S., Rockenstein, E. M., Galasko, D., Masliah, E., and Rissman, R. A. (2016) Prediction of conversion from mild cognitive impairment to dementia with neuronally derived blood exosome protein profile, *Alzheimer's Dement.*, **3**, 63-72, doi: 10.1016/j.dadm.2016.04.001.
11. Fauré, J., Lachenal, G., Court, M., Hirrlinger, J., Chatellard-Causse, C., Blot, B., Grange, J., Schoehn, G., Goldberg, Y., Boyer, V., Kirchhoff, F., Raposo, G., Garin, J., and Sadoul, R. (2006) Exosomes are released by cultured cortical neurons, *Mol. Cell. Neurosci.*, **31**, 642-648, doi: 10.1016/J.MCN.2005.12.003.
12. Gosselin, R.-D., Meylan, P., and Decosterd, I. (2013) Extracellular microvesicles from astrocytes contain functional glutamate transporters: regulation by protein kinase C and cell activation, *Front. Cell. Neurosci.*, **7**, 251, doi: 10.3389/FNCEL.2013.00251.
13. Krämer-Albers, E. M., Bretz, N., Tenzer, S., Winterstein, C., Möbius, W., Berger, H., Nave, K. A., Schild, H., and Trotter, J. (2007) Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: trophic support for axons? *Proteomics Clin. Appl.*, **1**, 1446-1461, doi: 10.1002/prca.200700522.
14. Kowal, J., Arras, G., Colombo, M., Jouve, M., Morath, J. P., Primdal-Bengtson, B., Dingli, F., Loew, D., Tkach, M., and Théry, C. (2016) Proteomic comparison defines novel markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle subtypes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E968-E977, doi: 10.1073/pnas.1521230113.
15. Savina, A., Furlán, M., Vidal, M., and Colombo, M. I. (2003) Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells, *J. Biol. Chem.*, **278**, 20083-20090, doi: 10.1074/jbc.M301642200.
16. Emmanouilidou, E., Melachroinou, K., Roumeliotis, T., Garbis, S. D., Ntzouni, M., Margaritis, L. H., Stefanis, L., and Vekrellis, K. (2010) Cell-produced α -synuclein is secreted in a calcium-dependent manner by exosomes and impacts neuronal survival, *J. Neurosci.*, **30**, 6838-6851, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5699-09.2010.
17. Frühbeis, C., Fröhlich, D., Kuo, W. P., Amphornrat, J., Thilemann, S., Saab, A. S., Kirchhoff, F., Möbius, W., Goebels, S., Nave, K. A., Schneider, A., Simons, M., Klugmann, M., Trotter, J., and Krämer-Albers, E. M. (2013) Neurotransmitter-triggered transfer of exosomes mediates oligodendrocyte-neuron communication, *PLoS Biol.*, **11**, e1001604, doi: 10.1371/journal.pbio.1001604.
18. Kapustin, A. N., Chatrou, M. L., Drozdov, I., Zheng, Y., Davidson, S. M., Soong, D., Furmanik, M., Sanchis, P., De Rosales, R. T., Alvarez-Hernandez, D., Shroff, R., Yin, X., Muller, K., Skepper, J. N., Mayr, M., Reutelingsperger, C. P., Chester, A., Bertazzo, S., Schurgers, L. J., and Shanahan, C. M. (2015) Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion, *Circ. Res.*, **116**, 1312-1323, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.305012.
19. Wang, H. G., Pathan, N., Ethell, I. M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T. F., and Reed, J. C. (1999) Ca^{2+} -induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD, *Science*, **284**, 339-343, doi: 10.1126/science.284.5412.339.
20. Lee, M. S., Kwon, Y. T., Li, M., Peng, J., Friedlander, R. M., and Tsai, L. H. (2000) Neurotoxicity induces cleavage of p35 to p25 by calpain, *Nature*, **405**, 360-364, doi: 10.1038/35012636.
21. White, B. C., Sullivan, J. M., DeGracia, D. J., O'Neil, B. J., Neumar, R. W., Grossman, L. I., Rafols, J. A., and Krause, G. S. (2000) Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury, *J. Neurol. Sci.*, **179**, 1-33, doi: 10.1016/S0022-510X(00)00386-5.
22. Hardingham, G. E., Fukunaga, Y., and Bading, H. (2002) Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways, *Nat. Neurosci.*, **5**, 405-414, doi: 10.1038/nn835.
23. Szydłowska, K., and Tymianski, M. (2010) Calcium, ischemia and excitotoxicity, *Cell Calcium*, **47**, 122-129, doi: 10.1016/j.ceca.2010.01.003.
24. Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000) The versatility and universality of calcium signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **1**, 11-21, doi: 10.1038/35036035.
25. Cooney, J. R., Hurlburt, J. L., Selig, D. K., Harris, K. M., and Fiala, J. C. (2002) Endosomal compartments

- serve multiple hippocampal dendritic spines from a widespread rather than a local store of recycling membrane, *J. Neurosci.*, **22**, 2215-2224, doi: 10.1523/jneurosci.22-06-02215.2002.
26. Malinow, R., and Malenka, R. C. (2002) AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity, *Annu. Rev. Neurosci.*, **25**, 103-126, doi: 10.1146/annurev.neuro.25.112701.142758.
27. Brecht, D. S., and Nicoll, R. A. (2003) AMPA receptor trafficking at excitatory synapses, *Neuron*, **40**, 361-379, doi: 10.1016/S0896-6273(03)00640-8.
28. Lee, S. H., Simonetta, A., and Sheng, M. (2004) Subunit rules governing the sorting of internalized AMPA receptors in hippocampal neurons, *Neuron*, **43**, 221-236, doi: 10.1016/j.neuron.2004.06.015.
29. Mathieu, M., Névo, N., Jouve, M., Valenzuela, J. I., Maurin, M., Verweij, F. J., Palmulli, R., Lankar, D., Dingli, F., Loew, D., Rubinstein, E., Boncompain, G., Perez, F., and Théry, C. (2021) Specificities of exosome versus small ectosome secretion revealed by live intracellular tracking of CD63 and CD9, *Nat. Commun.*, **12**, 1-18, doi: 10.1038/s41467-021-24384-2.
30. Lachenal, G., Pernet-Gallay, K., Chivet, M., Hemming, F. J., Belly, A., Bodon, G., Blot, B., Haase, G., Goldberg, Y., and Sadoul, R. (2011) Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity, *Mol. Cell. Neurosci.*, **46**, 409-418, doi: 10.1016/j.mcn.2010.11.004.
31. Ghidoni, R., Paterlini, A., Albertini, V., Glionna, M., Monti, E., Schiaffonati, L., Benussi, L., Levy, E., and Binetti, G. (2011) Cystatin C is released in association with exosomes: a new tool of neuronal communication which is unbalanced in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*, **32**, 1435-1442, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.08.013.
32. Karttunen, J., Heiskanen, M., Joki, T., Hyysalo, A., Navarro-Ferrandis, V., Miettinen, S., Narkilahti, S., and Pitkänen, A. (2022) Effect of cell culture media on extracellular vesicle secretion from mesenchymal stromal cells and neurons, *Eur. J. Cell Biol.*, **101**, 151270, doi: 10.1016/j.ejcb.2022.151270.
33. Olivero, G., Cisani, F., Marimpietri, D., Di Paolo, D., Gagliani, M. C., Podestà, M., Cortese, K., and Pittaluga, A. (2021) The depolarization-evoked, Ca²⁺-dependent release of exosomes from mouse cortical nerve endings: new insights into synaptic transmission, *Front. Pharmacol.*, **12**, 670158, doi: 10.3389/fphar.2021.670158.
34. Pittaluga, A. (2019) Acute functional adaptations in isolated presynaptic terminals unveil synaptosomal learning and memory, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 3641, doi: 10.3390/ijms20153641.
35. Südhof, T. C. (2004) The synaptic vesicle cycle, *Annu. Rev. Neurosci.*, **27**, 509-547, doi: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131412.
36. Schiera, G., Proia, P., Alberti, C., Mineo, M., Savettieri, G., and di Liegro, I. (2007) Neurons produce FGF2 and VEGF and secrete them at least in part by shedding extracellular vesicles, *J. Cell. Mol. Med.*, **11**, 1384-1394, doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00100.x.
37. Goldie, B. J., Dun, M. D., Lin, M., Smith, N. D., Verrills, N. M., Dayas, C. V., and Cairns, M. J. (2014) Activity-associated miRNA are packaged in Map1b-enriched exosomes released from depolarized neurons, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 9195-9208, doi: 10.1093/nar/gku594.
38. Morel, L., Regan, M., Higashimori, H., Ng, S. K., Esau, C., Vidensky, S., Rothstein, J., and Yang, Y. (2013) Neuronal exosomal miRNA-dependent translational regulation of astroglial glutamate transporter GLT1, *J. Biol. Chem.*, **288**, 7105-7116, doi: 10.1074/JBC.M112.410944.
39. Chivet, M., Javalet, C., Laulagnier, K., Blot, B., Hemming, F. J., and Sadoul, R. (2014) Exosomes secreted by cortical neurons upon glutamatergic synapse activation specifically interact with neurons, *J. Extracell. Vesicles*, **3**, 24722, doi: 10.3402/jev.v3.24722.
40. Baietti, M. F., Zhang, Z., Mortier, E., Melchior, A., Degeest, G., Geeraerts, A., Ivarsson, Y., Depoortere, F., Coomans, C., Vermeiren, E., Zimmermann, P., and David, G. (2012) Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 677-685, doi: 10.1038/ncb2502.
41. Laporte, M. H., Chi, K. II, Caudal, L. C., Zhao, N., Schwarz, Y., Rolland, M., Martinez-Hernandez, J., Martineau, M., Chatellard, C., Denarier, E., Mercier, V., Lemaître, F., Blot, B., Moutaux, E., Cazorla, M., Perrais, D., Lanté, F., Bruns, D., Fraboulet, S., Hemming, F. J., Kirchhoff, F., and Sadoul, R. (2022) Alix is required for activity-dependent bulk endocytosis at brain synapses, *PLoS Biol.*, **20**, e3001659, doi: 10.1371/journal.pbio.3001659.
42. Washbourne, P., Thompson, P. M., Carta, M., Costa, E. T., Mathews, J. R., Lopez-Bendito, G., Molnár, Z., Becher, M. W., Valenzuela, C. F., Partridge, L. D., and Wilson, M. C. (2002) Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis, *Nat. Neurosci.*, **5**, 19-26, doi: 10.1038/NN783.
43. Schulze, K. L., Broadie, K., Perin, M. S., and Bellen, H. J. (1995) Genetic and electrophysiological studies of *Drosophila* syntaxin-1A demonstrate its role in nonneuronal secretion and neurotransmission, *Cell*, **80**, 311-320, doi: 10.1016/0092-8674(95)90414-X.
44. Schoch, S., Deák, F., Königstorfer, A., Mozhayeva, M., Sara, Y., Südhof, T. C., and Kavalali, E. T. (2001) SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice, *Science*, **294**, 1117-1122, doi: 10.1126/SCIENCE.1064335.

45. Nonet, M. L., Saifee, O., Zhao, H., Rand, J. B., and Wei, L. (1998) Synaptic transmission deficits in *Caenorhabditis elegans* synaptobrevin mutants, *J. Neurosci.*, **18**, 70-80, doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-01-00070.1998.
46. Gerst, J. E. (1999) SNAREs and SNARE regulators in membrane fusion and exocytosis, *Cell. Mol. Life Sci.*, **55**, 707-734, doi: 10.1007/S000180050328.
47. Stenmark, H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**, 513-525, doi: 10.1038/nrm2728.
48. Shirakawa, R., Yoshioka, A., Horiuchi, H., Nishioka, H., Tabuchi, A., and Kita, T. (2000) Small GTPase Rab4 regulates Ca²⁺-induced α -granule secretion in platelets, *J. Biol. Chem.*, **275**, 33844-33849, doi: 10.1074/jbc.M002834200.
49. Raffaniello, R. D., Lin, J., and Raufman, J.-P. (1996) Actions and expression of RAB-GDP dissociation inhibitor in dispersed chief cells from guinea pig stomach, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **225**, 232-237, doi: 10.1006/bbrc.1996.1159.
50. Regazzi, R., Ravazzola, M., Iezzi, M., Lang, J., Zahraoui, A., Andereggen, E., Morel, P., Takai, Y., and Wollheim, C. B. (1996) Expression, localization and functional role of small GTPases of the Rab3 family in insulin-secreting cells, *J. Cell Sci.*, **109**, 2265-2273, doi: 10.1242/jcs.109.9.2265.
51. Smith, J., Thompson, N., Thompson, J., Armstrong, J., Hayes, B., Crofts, A., Squire, J., Teahan, C., Upton, L., and Solari, R. (1997) Rat basophilic leukaemia (RBL) cells overexpressing Rab3a have a reversible block in antigen-stimulated exocytosis, *Biochem. J.*, **323**, 321-328, doi: 10.1042/bj3230321.
52. Holz, R. W., Brondyk, W. H., Senter, R. A., Kuizon, L., and Macara, I. G. (1994) Evidence for the involvement of Rab3A in Ca²⁺-dependent exocytosis from adrenal chromaffin cells, *J. Biol. Chem.*, **269**, 10229-10234, doi: 10.1016/S0021-9258(17)34051-6.
53. Doussau, F., Clabecq, A., Henry, J.-P., Darchen, F., and Poulain, B. (1998) Calcium-dependent regulation of Rab3 in short-term plasticity, *J. Neurosci.*, **18**, 3147-3157, doi: 10.1523/jneurosci.18-09-03147.1998.
54. Ostrowski, M., Carmo, N. B., Krumeich, S., Fanget, I., Raposo, G., Savina, A., Moita, C. F., Schauer, K., Hume, A. N., Freitas, R. P., Goud, B., Benaroch, P., Hacoen, N., Fukuda, M., Desnos, C., Seabra, M. C., Darchen, F., Amigorena, S., Moita, L. F., and Thery, C. (2010) Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway, *Nat. Cell Biol.*, **12**, 19-30, doi: 10.1038/ncb2000.
55. Savina, A., Fader, C. M., Damiani, M. T., and Colombo, M. I. (2005) Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner, *Traffic*, **6**, 131-143, doi: 10.1111/j.1600-0854.2004.00257.x.
56. Sun, C., Wang, P., Dong, W., Liu, H., Sun, J., and Zhao, L. (2020) LncRNA PVT1 promotes exosome secretion through YKT6, RAB7, and VAMP3 in pancreatic cancer, *Ageing*, **12**, 10427, doi: 10.18632/AGING.103268.
57. Brady, S. T., Siegel, G. J., Albers, R. W., and Price, D. L. (2011) *Basic Neurochemistry: Principles of Molecular, Cellular, and Medical Neurobiology*, Eighth Edition, doi: 10.1016/C2009-0-00066-X.

NEURONAL EXOSOMES AS A NEW SIGNALING SYSTEM

Review

A. A. Yakovlev^{1,2}

¹ *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Science, 117485 Moscow, Russia; e-mail: al_yakovlev@ihna.ru*

² *Scientific and Practical Psychoneurological Center named after Z. P. Solovy'ov, Moscow Healthcare Department, 115419 Moscow, Russia*

Every year more and more works are devoted to the study of neuronal exosomes. The potential of exosomes as diagnostic markers for neurodegenerative diseases has been significantly explored., and similar marker search patterns have been adopted for the study of psychiatric pathologies. The fundamentals of exosome biogenesis in different cell types have been elucidated., the physiological significance of exosomes is being actively studied., and many aspects of signaling with their participation are being elucidated. At the same time., data have been accumulated pointing to the role of exosomal signaling as an important element of interneuronal communication. Do we have enough evidence to call exosomes a new non-canonical neurotransmitter in the brain? This discussion work is devoted to answering this question., in which the author presents to the scientific community the concept of the possible role of brain exosomes as a signaling system.

Keywords: exosomes, extracellular vesicles, neurons, depolarization, calcium, Rab small GTPases, SNARE complex

СИСТЕМА МЕТАБОЛИЗМА CoA И АЦЕТИЛ-CoA ГОЛОВНОГО МОЗГА В МЕХАНИЗМАХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

Обзор

© 2023 А.Г. Мойсеёнок^{1*}, Н.П. Канунникова^{1,2}

¹ Институт биохимии биологически активных соединений НАН Беларуси,
230023 Гродно, Беларусь; электронная почта: andrey.moiseenok@tut.by

² Гродненский государственный университет имени Я. Купалы, 230023 Гродно, Беларусь

Поступила в редакцию 11.11.2022

После доработки 18.01.2023

Принята к публикации 07.02.2023

Рассматриваются процессы биотрансформации пантотеновой кислоты (Pan) в биосинтезе и гидролизе CoA, ключевая роль пантотенаткиназы (PANK) и CoA-синтетазы (CoASY) в формировании приоритетного митохондриального пула CoA при высоком метаболическом обороте кофермента и ограничении транспорта Pan через гематоэнцефалический барьер. Система ацетил-CoA – вторичного мессенджера, основного субстрата процессов ацетилирования, включая образование N-ацетиласпартата и ацетилхолина, посттрансляционной модификации гистонов, предопределяет защиту нейронов от дегенеративных сигналов и холинергическую нейротрансмиссию. Описаны биохимические механизмы нейродегенеративных синдромов при дефекте PANK и CoASY и возможности коррекции биосинтеза CoA в нокаутных по генам, кодирующим данные ферменты, моделях. Приводятся данные посмертного изучения головного мозга пациентов с болезнями Хантингтона и Альцгеймера, доказывающие дефицит Pan в ЦНС, наиболее выраженный в патогномоничных патологии нейроструктурах. Во фронтальной коре пациентов с болезнью Паркинсона выявлена сочетанная иммуофлуоресценция анти-CoA и анти-тау-белка, отражающая CoA-илирование в процессе димеризации тау-белка, и его редокс-чувствительность. Редокс-активность и антиокислительные свойства предшественников биосинтеза CoA подтверждены *in vitro* на синапсомембранных мембранах и митохондриях, при моделировании алюминиевого нейротоксикоза, сопровождающегося снижением уровня CoA в ЦНС. Способность предшественников биосинтеза CoA стабилизировать пул глутатиона в нейроструктурах, в частности в гиппокампе, рассматривается как патогенетический механизм протекции при воздействии нейротоксинов, развития нейровоспаления и нейродегенерации и обосновывает сочетанное применение производных Pan (например, D-пантенола) и предшественников глутатиона (N-ацетилцистеин). С учётом открытия новых функций CoA – редокс-зависимых процессов CoA-илирования белков, возможной ассоциации окислительного стресса и дефицита Pan (CoA) при нейродегенеративной патологии, изучение биодоступности и биотрансформации производных Pan, в частности, D-пантенола, 4'-фосфопантетеина, его ацилированных производных и композиций с редокс-фармакологическими соединениями перспективно как потенциальных этиопатогенетических средств.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биосинтез CoA, пантотенаткиназа, CoA-синтетаза, ацетил-CoA, ацил-CoA, нейродегенерация, болезнь Альцгеймера, дефицит пантотеновой кислоты в ЦНС, глутатион, окислительный стресс.

DOI: 10.31857/S0320972523040036, **EDN:** AKESXW

Принятые сокращения: A β – β -амилоид; ACh – ацетилхолин; AcCoA – ацетил-CoA; ACLY – АТФ-цитратлиаза; ACS – ацил-CoA-синтетаза; ACSS – AcCoA-синтаза; AD – болезнь Альцгеймера; BHB – β -гидроксibuтират; CoASY – CoA-синтетаза; COPAN – нейродегенерация с дефектом CoASY; dPCoA – дефосфо-CoA; ENPP – эктонуклеотидпиримидинфосфатаза; GP – бледный шар; GPan – гомопантотенат; HD – болезнь Хантингтона; hSMVT – мультивитаминовый переносчик Pan в сосудах человека; NAA – N-ацетиласпартат; NAC – N-ацетилцистеин; NBIA – нейродегенерация с накоплением железа; NUDT – нуклеозиддифосфатаза (нудикс); Pan – пантотеновая кислота; PANK – пантотенаткиназа; PanSH (SS) – пантетеин (пантетин); PD – болезнь Паркинсона; PKAN – пантотенаткиназа-ассоциированная нейродегенерация; PL – D-пантенол; PPan – 4'-фосфо-пантотеновая кислота; PPanSH(SS) – 4'-фосфо-пантетеин (пантетин); VNN – пантетеиназа (ванин).

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

2023 год является юбилейным в истории открытия и первоначального изучения пантотеновой кислоты (Pan, витамин B5) и кофермента ацетилирования (CoA), идентификация которого связана с описанием кофактора синтеза ацетилхолина в ацетоновых экстрактах мозга (D. Nachmansohn, 1943 г.) и исследованием его структуры и основных функций (F. Lipman, 1948 г.), оценённых Нобелевской премией [1]. CoA-зависимый синтез ацетилхолина (ACh) изначально отнесён к фундаментальному процессу функционирования холинергической системы ЦНС [2]. Идентичность кофактора в реакциях ацетилирования холина и сульфаниламидов стала причиной его названия как кофермента ацетилирования, хотя последующее изучение CoA-зависимых реакций показало более правильное детерминирование как кофермента ацилирования [3, 4]. CoA и его тиоэфирные производные, предшественники биосинтеза CoA, участвуют в более чем 4% биохимических реакций, осуществляя функцию активации и переноса ацильных фрагментов, посттрансляционной модификации белков и экспрессии генов. Значение системы CoA в регуляции метаболизма, поддержании метаболического гомеостаза и обеспечении физиологических функций организма высших животных и человека рассмотрено в фундаментальных обзорах [5–10], существенно изменивших представления о биологической роли пантотеновой кислоты, CoA и их производных [3–5, 11, 12]. В последнее время интерес к данной проблеме чрезвычайно вырос в связи с новыми данными о роли системы CoA/ацетил-CoA в клетках и субклеточных структурах ЦНС, развитии окислительного стресса и обезвреживании нейротоксинов, механизмах развития нейродегенеративной патологии [8–10, 13]. Катализатором интереса исследователей и медицинского сообщества к системе CoA стало описание Zhou et al. [14] генетического дефекта фермента биосинтеза CoA при нейродегенерации, квалифицированной как пантотенаткиназа-ассоциированная нейродегенерация (Pantothenate kinase-associated neurodegeneration, PKAN) и последующее выявление дефекта CoA-синтетазы (CoASY) при сходной врождённой патологии (COPAN) [15, 16].

При обстоятельном рассмотрении механизмов развития PKAN и COPAN [9, 16], а также в других обзорах не оценён статус витамина B5 при распространённой нейродегенеративной патологии и очевидный диссонанс

между высокой интенсивностью CoA-зависимых процессов и ограниченностью биодоступности Pan в структурах ЦНС. В настоящем обзоре восполняются указанные пробелы и рассматривается роль систем метаболизма CoA/ацетил-CoA в механизмах нейропротекции, ассоциированных с энергообеспечением и холинергической нейротрансмиссией головного мозга, анализируется роль системы биосинтеза CoA при развитии окислительного стресса [13] – непереносимого предшественника и спутника нейродегенеративной патологии. Обращается внимание на результаты исследований антиоксидантных свойств предшественников биосинтеза CoA – производных Pan [17], их роли в регуляции клеточного редокс-статуса [18, 19], взаимосвязи с системой глутатиона (GSH) [20, 21] и выявление CoA-илирования различных белков и ферментов основных метаболических циклов [22], что открывает перспективу для расширенного поиска технологий предупреждения и коррекции нарушений функций ЦНС, прежде всего, при возрастной патологии.

СИСТЕМА БИОСИНТЕЗА И ГИДРОЛИЗА КОФЕРМЕНТА А В ЦНС

Пантотеновая кислота представляет N-(2,4-диокси-3,3-диметил-1-бутирил)-β-аминопропионовую кислоту, фактор питания, необходимый организму высших животных и человека в количестве 0,1–2,5 мг/кг массы тела для роста и развития, обеспечения метаболического гомеостаза. Биологической активностью обладает только D(+)-изомер витамина и его производных, хотя L(–)-изомер при поступлении в фармацевтических субстанциях может препятствовать усвоению D-формы Pan и, возможно, трансформироваться в неё под действием кишечных рацемаз, дополняя несомненную роль биоценоза желудочно-кишечного тракта в физиологическом статусе обеспеченности организма витамином B5. Источником Pan и Pan-содержащих соединений являются S-сульфопроизводные витамина, а именно S-сульфо-пантетеин (S-сульфо-PanSH) и иные продукты этой группы, являющиеся рост-стимулирующими факторами бифидобактерий кишечника, преобладающими в биоценозе в младенческом возрасте [4].

В оценке потребности человека в Pan, зависящей от возраста, пола, энерготрат, воздействия экстремальных факторов, исходят из соотношений 4–5 мг/1 ккал пищевых веществ или 0,1 мг/кг массы тела, но большинство

рекомендаций для взрослого человека указывает суточную потребность, равную 4–10 мг. Потребление витамина B5 может быть критерием оценки пищевого статуса населения ЕС в возрасте до 65 лет, ассоциированного со средним ВВП на душу населения, и обнаруживает неблагоприятную картину колебаний суточного потребления Pan от 5,3–6,0 мг (Ирландия) до 2,2–2,6 мг (Польша) [23]. При этом остаётся неясной значимость основного биомаркера оценки B5-витаминного статуса – экскреции свободной Pan с мочой без исключения экскреции её фосфорилированного метаболита – 4'-фосфо-Pan (PPan) – и иных витаминсодержащих метаболитов с калом [4].

Основной источник Pan – пищевые продукты, в том числе обогащённые витамином B5, и биологически активные добавки к пище, активной субстанцией в которых могут быть Pan, пантетеин (PanSH) и ксенобиотический предшественник Pan – D-пантенол (PL). Свободная Pan абсорбируется энтероцитами посредством Na-зависимого мультивитаминного переносчика SMVT. Ранние исследования указывают на уровень Pan в диапазоне 100–380 нг/мл цельной крови [4], идентификация CoA в плазме крови (≈ 9 нМ) требует корректного подтверждения [7]. Гидролиз CoA и ацетил-CoA (≈ 3 нМ) в плазме крови происходит чрезвычайно быстро. В то же время присутствие CoA в эритроцитах (до 9,7 мкг/мл), показанное первооткрывателями кофермента в 1948 г. [7, 10], получило дополнительное обоснование по результатам наших исследований эритроцитарного биосинтеза CoA [24] и развития дефектов эритроцитарных мембран при РКАН (нейроакантоцитоз) [25]. Перспективным биомаркером статуса обеспеченности Pan является уровень CoA в лейкоцитах, который нами апробирован в целях контроля эффективности назначения препаратов Pan (Ca^{2+} -соль) и пантетина (PanSS) в комплексной терапии абстинентного синдрома и алкогольного делирия.

Начальной стадией биотрансформации Pan является пантотенаткиназная реакция, катализируемая PANK, представленной четырьмя изоформами – PANK 1 α , 1 β , 2 и 3. Субклеточная локализация изоформ (1 α – клеточное ядро, 1 β – цитозоль и эндосомы; 2 – мембранное пространство ядер и митохондрий, 3 – цитозоль) позволяет синхронизировать всю систему биосинтеза CoA в зависимости от воздействия продуктов биосинтеза и ацил-CoA (ацил-CoA угнетает PANK 2 и 3 с IC₅₀ 1 мкМ), прежде всего, от соотношения CoA-SH/ацетил-CoA. Продукт PANK конден-

сируется с цистеином в 4'-фосфо-пантотеноилцистеин, декарбоксилирующийся в 4'-фосфопантетеин (PPanSH). Этот этап катализируют 4'-фосфопантотеноилцистеинсинтетаза (PPCS) и 4'-фосфопантотеноилцистеиндекарбоксилаза (PPCDC). Окончательный этап образования CoA осуществляется бифункциональным комплексом синтетазы CoA (CoASY), включающим фосфопантетеинаденилтрансферазу (PPAT) и дефосфо-CoA-киназу (DPCK). Установлено, что CoASY является, наряду с PANK, регулятором всего пути биосинтеза CoA [5, 6, 26, 27]. Примечательно, что изоформы CoASY, кодируемые одним геном, имеют полиоргано-распространение, но преимущественной формой фермента в мозге является β -CoASY. Получены данные о локализации фермента на внутренней и внешней митохондриальной мембране, матриксе митохондрий, тогда как предшествующий ансамбль ферментов биосинтеза CoA представлен в цитозоле. Активность CoASY регулируется фосфорилированием/дефосфорилированием по остаткам тирозина и активируется фосфолипидами [28]. Субстратами CoASY могут быть PPanSH и dPCoA, происходящие из метаболизма ацил-CoA в митохондриях, лизосомах, пероксисомах и ядре. Ключевая роль здесь может принадлежать эктонуклеотидпирофосфатазам (ENPP), представленным также в микробиоте и, следовательно, пополняющим внеклеточный фонд PPanSH, относительно свободно диффундирующего через биологические мембраны и отличающегося, в целом, высокой биодоступностью [29].

Достигнут значительный прогресс в изучении процессов гидролиза CoA и его метаболитов, их участия в реутилизации Pan-содержащих соединений [6]. Внеклеточные пути деградации кофермента при усвоении пищи начинаются с дефосфорилирования CoA в дефосфо-CoA (dPCoA) под воздействием щелочной фосфатазы, а далее – с участием ENPP/фосфодиэстеразы – в PPanSH. Возможен его перенос в кровообращение и гидролиз по амидной связи пантетеиназой (VNN, ванин) с образованием Pan и цистеамина. В тканях млекопитающих идентифицированы три изоформы VNN, например, в энтероцитах тощей кишки и эпителии проксимальных канальцев почки. ENPP и VNN распространены на мембранах эпителиальных клеток и интерстициальных пространств в виде растворимых форм и обеспечивают системную деградацию CoA. Изоформа VNN3 сверхэкспрессируется при системном воспалении и окислительном стрессе [6].

В отличие от PPanSH или PanSH, процессы гидролиза CoA локализованы внутриклеточно. В митохондриях активна нуклеозиддифосфатаза (нудикс, NUDT8), гидролизующая CoA и ацил-CoA по дифосфатной связи с образованием PPanSH или ацил-PPanSH и 3',5'-ADP. Специфичность NUDT-гидролаз различна по отношению к ацил-CoA, некоторые могут также гидролизовать CoA с образованием ацил-PPanSH, который, вероятно, под действием ацил-CoA-тиоэстеразы (ACOT) метаболизируется в PPanSH [6].

Пероксисомальный путь метаболизма CoA и ацил-CoA, реагирующий на состояние голодания/кормления и структуру диеты (вероятно, через сигналинг пути PPAR α), характеризуется активностью NUDT [6, 9] и освобождением PPanSH из ацил-PPanSH под действием ACOT [6, 12] в клеточный интерстициум путём свободной трансмембранной диффузии или прямого выхода CoA из пероксисом. Депонированные в лизосомах ацил-CoA и CoA под действием кислой фосфатазы 2 теряют фосфатную группу с образованием дефосфо-CoA или ацил-dPCoA. Ассоциация фосфатазы и пальмитоилтиоэстеразы (PPT), отличающейся широкой специфичностью, делает возможным поступление dPCoA в цитозоль для реутилизации [6, 7, 9]. Стабилизация системы CoA/ацил-CoA обеспечивается разнообразием путей поступления предшественников биосинтеза CoA, прежде всего, PPanSH [29], включая биоценоз кишечника и продукты реакций деградации CoA при изменяющихся потребностях организма в витамине B5 в различных физиологических и экстремальных ситуациях [4, 29, 30].

Внутренняя мембрана митохондрий, пероксисомы и эндоплазматический ретикулум непроницаемы для метаболитов CoA, но ядерные поры и внешняя митохондриальная мембрана не являются препятствием для двустороннего переноса. Депонирование CoA в мозге не является доминирующим (высокие концентрации в печени и миокарде, ниже – в бурой жировой ткани и почках), но оборот молекулы кофермента в ЦНС чрезвычайно высок [9]. Результаты исследования уровня CoA в ЦНС несколько настораживают, поскольку микробиоанализ концентрации Pan в головном мозге показывает величину, близкую к 100 мкМ, включая 20% свободной формы [29], что может отражать, наряду с CoA, фракции предшественников CoA (PPanSH, dPCoA). Доминирует внутримитохондриальный фонд CoA (1–5 мМ), ниже – концентрация в пероксисомах (0,7 мМ), цитозоле, ядре и эндоплаз-

матическом ретикулуме (0,1–0,4 мМ) [5, 6, 9]. Высокий митохондриальный уровень CoA соответствует ключевой его роли, равно как и ацетил-CoA в регуляции активности пируватдегидрогеназного комплекса, воздействия малонил-CoA на активность карнитинпальмитоилтрансферазы 1 и стабилизации β -окисления жирных кислот [29, 30]. Обстоятельно изучен процесс посттрансляционной модификации гистонов, связующий элемент системы CoA и модуляции экспрессии генов. Ацетилирование (по лизиновому остатку) ряда ферментов и сигнальных молекул изменяет функцию, локализацию, устойчивость и ассоциацию с другими компонентами, что оценивается как прямой контроль энергопродукции, роста и митоза клеток, аутофагии и апоптоза [30], при этом важное значение принадлежит процессам ацилирования/деацилирования [31].

С учётом интенсивности CoA-зависимых процессов детоксикации и взаимодействия ацил-CoA с аминокислотами (глицин, глутамин) становится объяснимым высокий уровень метаболического оборота внутриклеточного CoA. Установлена более высокая скорость метаболизма пантотенатов в печени по сравнению с мозгом в обеих гендерных группах [32]. При пероральном введении период полураспада CoASH в печени составил 69 ± 5 ч (самцы) и 82 ± 6 ч (самки), а в мозге – 136 ± 14 ч (самцы) и 144 ± 12 ч (самки). Период полураспада ацетил-CoA составил 71–74 ч в печени и 117–158 ч – в мозге. Близкие результаты получены при внутримозговом введении фосфометпантотената (общий CoA – 144 ± 17 ч в мозге) [32]. Расчёт показывает, что всё содержание CoA в организме подвержено циклу ацетилирования/деацетилирования продолжительностью 30 с [33].

Вероятной причиной высокого оборота CoA является также и его участие в посттрансляционной модификации белков в форме CoA-илирования. Этот процесс изучен группой исследователей под руководством Gout и Filonenko [34] благодаря разработке моноклональных антител, специфических к CoA и идентифицируемых масс-спектрометрией в виде анти-CoA-иммунопреципитатов. Установлено, что CoA-илирование индуцируется голоданием, метаболическим и окислительным стрессом и модифицирует свыше 500 белков и ферментов, в том числе участвующих в системе антиоксидантной защиты [8, 22]. Обсуждается соотношение двух механизмов посттрансляционной модификации белков: упомянутых выше CoA-илирования и 4'-фосфопантетилирования, зависящих от уровня CoA

и S-глутатионилирования [8, 22]. Процесс CoA-илирования возрастает при увеличении уровня кофермента, тогда как PPanSH-илирование снижается, что может проявиться в разнонаправленных эффектах таргетных к CoA белков [8].

Применение метода близости лигирования (PLA, Proximity Ligation Assay) для изучения межбелкового взаимодействия ферментов биосинтеза CoA на культурах клеток и линии рака лёгких выявило ассоциацию белков синтеза CoA и фиксацию CoASY к внешней мембране митохондрий через гидрофобный N-конец, что контролируется сигнальными метаболическими путями и усиливается при окислительном стрессе [35].

Физиологическая концентрация CoA и ацетил-CoA в мозге грызунов составляют величины, равные $52,1 \pm 10,7$ и $6,0 \pm 1,9$ нмоль/г влажной ткани и несколько превышают данные исследований ($18-22$ нмоль/г), не использовавших микроволновую пробоподготовку [30, 36]. Это существенно ниже результата раннего анализа с применением метода N-ацетилирования (Kaplan, Lipman) [4], показавшего величины, близкие к $88,6$ нмоль/г, что можно объяснить дополнительной N-ацетилирующей активностью PPanSH и dPCoA [11, 29]. В гомогенате, синапсоммах и митохондриях мозга содержится ацетил-CoA в количествах $61,0$, $8,6$ и $31,3$ пмоль/мг белка [30, 37]. Клеточные фракции PPanSH и dPCoA, а также PPanSS, симметричных и несимметричных дисульфидов CoA (например CoASS-глутатиона) [20,29] были идентифицированы в печени, но не верифицированы современными методами. Показано, что PPanSH и dPCoA могут быть кофакторами в холинацетилазной и N-ацетилтрансферазной активности [29]. Длительное содержание крыс на диете с [14 C] Pan обнаруживает накопление значительных количеств этих метаболитов даже в условиях Pan-дефицита [38].

ТРАНСПОРТ ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЦНС

Исследование переноса Pan через гематоэнцефалический барьер показало существование низкоскоростной насыщаемой системы в капиллярах мозга с величиной переноса 19 мкмоль/литр у крыс и 30 мкмоль/литр — у кроликов, блокируемой среднепочечными жирными кислотами и биотином в концентрации <100 мкМ, впоследствии идентифицированной у человека как hSMVT [39]. Ве-

личина K_m транспорта 10-кратно превышала концентрацию витамина в плазме. Эксперименты с перфузируемым мозгом крыс определили максимальную скорость транспорта — $0,21$ нмоль/г·мин. Изучение депонирования [14 C] Pan при внутривенном и внутрижелудочковом введении показало поступление преимущественно нетрансформированного витамина в плазму крови, спинномозговую жидкость, сосудистое сплетение и нейроструктуры ЦНС. Поглощение Pan сосудистым сплетением характеризуется концентрацией полунасыщения транспорта, равной 10 мкМ, и при низких концентрациях сопровождается образованием PPan и не ингибируется цистеином [39, 40].

Процесс фосфорилирования [14 C] Pan продемонстрирован на срезах мозга кроликов и был ограничен 17% присутствующего в перфузате радионуклида ($0,5$ мкМ). Метаболиты PPan не обнаружены при исследовании срезов, а также в осадке их гомогената. В исследованиях с длительной экспозицией метки (18 ч после внутрижелудочкового введения 37 мкКи [3 H] Pan (34 нмоль)) до 40% радиоактивности в переднем отделе головного мозга выявлено во фракции CoA [40].

Процесс поглощения и биотрансформации [3 H] Pan, PPan и PanSS (анализируемый ЖХВД) структурами ЦНС существенно различен и характеризуется относительно более выраженной интенсивностью биосинтеза CoA (Pan) или фосфопантетеина/пантетина (PPan и PanSS), причём в последнем случае наблюдается дефосфорилирование и рефосфорилирование метаболитов с относительно низкой скоростью трансформации в CoA. Высокой биодоступностью в ЦНС и биотрансформацией в PPan обладает D-пантенол [41–44].

РОЛЬ АЦЕТИЛ-CoA В МЕХАНИЗМАХ НЕЙРОПРОТЕКЦИИ И ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ НЕЙРОТРАНСМИССИИ

Головной мозг может рассматриваться как уникальная биологическая структура, перенасыщенная процессами ацетилирования, продуктами которого являются N-ацетиласпарат (NAA), другие ацетилированные аминокислоты и амины, прежде всего, ACh, белки, компоненты метаболизма жирных кислот и липидов, гистонов, локализующиеся в различных субклеточных структурах, клетках и нейроструктурах в широком диапазоне концентраций ($10^{-2}-10^{-9}$ М) [30]. Основной субстрат реакций ацетилирования — ацетил-CoA (AcCoA) —

используется ацетилтрансферазами с различной специфичностью и локализацией, а также выполняет роль вторичного мессенджера [9, 29, 30] в процессах, обеспечивающих основные функции ЦНС. Например, изменение уровня АсСоА в холинергических нейронах базальной части лобных долей высших животных модулирует когнитивные функции, включая разные виды памяти, обучение, внимание и сенсорную информацию выбора избирательности и точности [45, 46]. Стратегически АсСоА можно рассматривать как метаболическую точку распределения между энергопродуцирующим циклом трикарбоновых кислот (ЦТК) и множественными ацетилтрансферазными реакциями, направленность и преобладание которых различно в субклеточных и клеточных структурах, отделах мозга и при изменении функционального состояния ЦНС. Есть все основания полагать, что синтез ацетил-СоА, катализируемый пируватдегидрогеназным комплексом (PDHC), является общей мишенью для различных нейродегенеративных сигналов. Существует мнение о том, что оптимальные уровни АТФ и АсСоА являются маркерами функциональной активности нейронов и других клеток мозга [47].

Митохондриальный компартмент нейронов является источником NAA, транспортирующейся в олигодендроциты и метаболизирующейся в синтезе жирных кислот и холестерина для образования миелина. Существенным источником β -гидроксibuтирата (ВНВ) являются астроциты, в которых относительно высокая скорость окисления жирных кислот. Митохондрии нейронов утилизируют АсСоА в ЦТК и в синтезе NAA. В цитозоле нейронов АсСоА происходит из различных источников: в цитратлиазной реакции (ACLY, АТФ-цитратлиаза), из ацетоацетата и ацетилкарнитина в соответствующих метаболических путях. Отдельный пул АсСоА существует в ядре и эндоплазматическом ретикулуме, где происходит ацетилирование гистонов и белков, АсСоА-опосредованная регуляция экспрессии генов и утилизации ряда белков. Нейрональный аксональный компартмент содержит ацетилированный белок, ассоциированный с тубулином, что обеспечивает аксональный транспорт [30].

АCh является филогенетически старейшим нейромедиатором [2]. Синтез АCh осуществляется холинацетилтрансферазой (ChAT), экспрессируемой исключительно в цитозоле холинергических нейронов. Снижение синтеза АсСоА и последующего образования энергии, например при старении, обуславливает возрастное снижение пластичности мозга и

повышение чувствительности к воздействию факторов нейродегенерации [48, 49]. Холинергические нейроны предрасположены к нейродегенерации в связи с высоким расходом АсСоА при синтезе АCh и NAA. Равновесие между гликолитическим синтезом АсСоА и его разнообразным потреблением, по-видимому, является ключевым фактором поддержания функциональной и структурной целостности нейронов и глиальных клеток [30]. Известны факторы возникновения дефицита АсСоА, воздействие которых приводит к холинергической энцефалопатии, такие как синтез и накопление β -амилоида (А β), гипоксия, гипогликемия, черепно-мозговая травма, вызывающие эксайтотоксическую активацию глутаматергических синапсов с высвобождением глутамата и ионов цинка [30, 46, 47]. Последующее их накопление в постсинаптических нейронах стимулирует образование кислородных и нитрозильных свободных радикалов, обладающих прямым ингибирующим действием на PDHC и обуславливающих подавление синтеза АсСоА, NAA и АТФ. Аналогичный процесс характерен для воздействия нейротоксических сигналов, инициируемых А β , Zn^{2+} , избытком NO, Ca^{2+} , дефицитом тиамина, воздействием ионов алюминия и гипоксии [30, 47].

Роль метаболизма цитрата в холинергических нейронах чрезвычайно велика, поскольку до 90% митохондриального АсСоА вступает в ЦТК посредством цитратсинтазы. Скорость высвобождения цитрата из астроцитов превышает таковую для нейронов в 12 раз [50]. Дальнейшая судьба продуктов ACLY связана с синтезом жирных кислот и холестерина в цитозоле нейронов и олигодендроцитов. Использование митохондриального АсСоА в синтезе NAA достаточно ограничено (1–3%) в реакции, катализируемой аспартат-N-ацетилтрансферазой, локализованной исключительно в митохондриях нейронов. Содержание NAA в цельном мозге оценивается в 10 мМ [30], но, вероятно, значительно выше – внутри митохондрий. При этом содержание АсСоА в митохондриях близко к величине 12 мкМ [46].

Механизмы деацетилирования ряда ацетилированных белков, гистонов и низкомолекулярных соединений, а также активность гидролазы АсСоА предполагают интенсивное накопление в клетках и структурах мозга ацетата. Его активация осуществляется АсСоА-синтазами (ACSS) 1 или 2, которые локализованы в митохондриях, цитозоле и ядре. Активность ACSS в нейронах более высокая, чем в астроцитах. Процесс утилизации NAA через аспартоацилазу и ACSS1 характерен

и для олигодендроцитов. Ацетат последних является оптимальным предшественником в синтезе жирных кислот и холестерина, используемых для синтеза структур миелина, обеспечения миелинизации и роста аксонов [46, 51].

В физиологических условиях поглощение мозгом кетоновых тел (ВНВ, ацетоацетат) происходит с низкой скоростью и соответствует их сродству к переносчику МСТ-2. Образование АсСоА происходит в реакции, катализируемой β -гидроксibuтиратдегидрогеназой, 3-кетоацил-СоА-тиолазой. В условиях кетонемии за счёт ВНВ может образовываться до 30% нейронального АсСоА [52]. Периодическое включение/выключение указанных путей образования АсСоА повышает пластичность нейронов и устойчивость мозга к стрессорному воздействию и механической травме, а также способствует улучшению когнитивных функций [53]. Предполагается, что ВНВ является предшественником в синтезе АСh при критических состояниях и очевидной блокаде процесса окисления пирувата [30].

Окисление жирных кислот (С8–С10), т.е. со средней длиной цепи, также осуществляется после их поглощения из кровообращения в цепи реакций, запускаемых АсСоА-дегидрогеназой митохондрий астроглии, что ассоциировано с образованием оксоглутарата, глутамина и его экспортом глутаматергическими и ГАМК-ергическими нейронами [54].

Ядерная мембрана с порами в 5–10 нм проницаема для АсСоА из цитозоля, равно как и большинства нуклеотидных аналогов АсСоА. Ядерный синтез последнего катализируется ферментами ACLY, ACSS2, PDHC и карнитин-ацетилтрансферазой. Пул АсСоА обеспечивает ацетилирование нескольких сотен белков, в числе которых гистоны, факторы транскрипции, шапероны и ферменты. Степень ацетилирования гистонов регулируется N-ацетилтрансферазой (NAT) и гистоновыми деацетилазами [55], что играет ключевую роль в регуляции промоторных сайтов и экспрессии генов в широком спектре фенотипических модификаций.

Митохондриальный АсСоА может быть ключевым метаболитом в защите нейронов от различных нейродегенеративных сигналов, в то время как цитозольный АсСоА в холинэргических нейронах регулирует скорость синтеза ацетилхолина и холинэргическую нейротрансмиссию, ответственную за поддержание когнитивных функций, а также внутриядерное ацетилирование [30]. За рамки обсуждения роли системы СоА/АсСоА в нейропротекции выходит рассмотрение участия ацил-СоА

в метаболизме фосфолипидов (подробнее см. обзор Fernandes и Ellis [31] о регуляторной роли ацил-СоА-синтетаз (ACS) в формировании разнообразия ацильных цепей фосфолипидов мозга).

Можно прогнозировать, что дальнейшие исследования роли Рап в метаболизме головного мозга будут сосредоточены на изучении липида, который является вторым по жировому компоненту (до 50% веса мозга, преимущественно, фосфолипиды) после жировой ткани. Все основные варианты метаболизма жирных кислот (окисление, депонирование в триацилглицерины или для синтеза и ремоделирования фосфолипидов) могут быть осуществлены только через стадию образования или гидролиза ацил-СоА, причём в некоторых физиологических и патологических ситуациях значимость ферментов, метаболизирующих ацил-СоА, является критической [56].

СИНДРОМЫ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОЙ ПАТОЛОГИИ, АССОЦИИРОВАННЫЕ С СИСТЕМОЙ БИОСИНТЕЗА СоА

Генетически детерминированный дефект гена *PANK2* проявляется в дистонии, дизартрии, ригидности и дегенерации сетчатки и ранее был известен как синдром Галлервордена–Шпатца [14]. Исключительно редкое (1–2/1 000 000) гетерогенное заболевание было отнесено к категории нейродегенераций с накоплением железа в головном мозге (NBIA) и детерминировано как PKAN (пантотенаткиназа-ассоциированная нейродегенерация, OMIM-234200). Визуализация области гиперинтенсивности в регионе медиального бледного шара (GP) сочеталась с проявлениями астроглиоза, микроглиоза, дегенерацией нейронов и аксональных сфероидов в GP. Описаны и атипичные формы PKAN с различным временем прогрессирования, невропсихическими и когнитивными нарушениями. Хотя гипотеза о дефиците СоА в нейроструктурах ЦНС не была окончательно подтверждена, предложено несколько экспериментальных моделей PKAN, демонстрирующих нарушение метаболизма железа, митохондриальную дисфункцию, прогрессирующий окислительный стресс и нарушения метаболизма жирных кислот [9, 16, 57]. При этом нокаутные мыши *PANK2* (KO) не проявляли симптомов нейродегенерации и не имели дефекта СоА в мозге, что проявлялось только при селективном удалении *PANK1* и *PANK2* из нейронов либо при сверхэкспрессии в них *NUDT* [9, 16].

Более определёнными оказались результаты изучения причины роста лабильного пула железа (LIP) в GP, ассоциированные с высоким уровнем рецептора трансферритина 1 (TfR1) и низким уровнем ферритина, приводящим, судя по активности аконитазы и содержанию гема, к дефекту Fe-зависимого биосинтеза белкового комплекса в митохондриях. В последних развивались дисфункция, метаболический стресс и повышение уровня GSH [9, 25]. Установлено нарушение при NBIA функции железосернистого кластера, сопряжённого с окислительным фосфорилированием и ассоциированного с регуляцией PDHC за счёт механизмов липоилирования ферментного комплекса и 4'-фосфопантетеинилирования ацил-переносающего белка митохондрий [58].

Нейродегенеративный синдром, обусловленный мутацией гена, кодирующего CoASY, проявляется симптоматикой, сходной с PKAN. Это исключительно редкое, аутосомально-рецессивное расстройство раннего детского возраста с симптомами дистонии, дизартрии, спастического парапареза, пассивно-компульсивным поведением и когнитивными нарушениями, квалифицируемое как COPAN (OMIM-615643) [15]. Магнитно-резонансная томография выявляет гиперинтенсивность и отёчность хвостатого ядра, покрышки и таламуса, однако исследования фибробластов пациентов не обнаружили снижения уровня CoA [16]. Разработка экспериментальных моделей, в т.ч. с селективной делецией гена *COASY* в нейронах, воспроизводила фенотипические признаки патологии, рост аккумуляции железа в мозге, но не дефект фонда CoA в ЦНС. Экспериментальная терапия в моделях PKAN и COPAN предполагала коррекцию уровня CoA и предупреждение аккумуляции железа в структурах GP. В клинических условиях применение Pan в коррекции нейродегенеративных синдромов оказалось неэффективным, хотя предлагалось более детально изучить активность PANK в эритроцитах человека [59]. Это может быть ценным биомаркером с учётом CoA-синтезирующей активности клеток крови [24] и симптома нейроакантоцитоза при PKAN [25]. Пантетин, дисульфидная форма PanSH, был успешно апробирован в экспериментальной терапии, но не проявил эффективности в клиническом наблюдении [60], что объяснялось высокой активностью VNN в крови. Обнадёживающие результаты получены с фосметпантотенатом, который является формой 4'-PPan с высокой способностью переноса через гематоэнцефалический барьер [9]. Однако многоцентровое клиническое изучение не

выявило эффективности препарата [61]. Экспериментальное изучение PPanSH выявило CoA-стимулирующую активность в моделях дефицита PANK или PPCDC, но не дефицита CoASY. Тем не менее проводится клиническое испытание этого предшественника CoA (<https://nbiacure.org/coaz-clinical-trial/>).

Наиболее эффективный путь преодоления дефицита CoA (вероятно, и предшественников его биосинтеза) в нейронах, порождающего симптомы тяжёлой нейродегенерации, был предложен в результате энзимологического подхода, направленного на альтернативную активацию PANK1 и PANK2 для преодоления врождённой или моделируемой патологии [62]. В результате скрининга среди соединений группы пантазина – активаторов и ингибиторов PANK3 – был избран препарат PZ-2891, обладающий высокой кооперативностью связи с протомером фермента и блокирующим эффектом ингибирования ацил-CoA по типу обратной связи [62]. На модели дефицита нейронального CoA, проявившегося снижением мРНК двух форм пантотенаткиназы (PANK1, PANK2), с применением PZ-2891 в составе рациона, установлено защитное действие препарата на двигательные нарушения, продолжительность жизни, развитие экспериментальных животных. Проводится клиническое изучение безопасности и эффективности препарата пантазина на здоровых добровольцах (<https://clinicaltrials.gov>). Можно предполагать, что в ближайшее время станут возможными клинические испытания препарата на основе PZ-2891 и вместе с тем откроется возможность направленной коррекции системы AcCoA/CoA при ряде нейродегенеративных заболеваний.

К числу чрезвычайно редких наследственных нейродегенеративных синдромов относятся нарушения функции митохондриального транспортёра CoA SLC25A42 (OMIM 610823) и транспортёра AcCoA эндоплазматического ретикулума SLC33A1 (OMIM 603690) [63], не ассоциированных с биосинтезом CoA [16, 57], но обусловленных нарушением гомеостаза CoA/AcCoA [9].

ДЕФИЦИТ ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

В рамках исследования «метаболома мозга» при болезни Хантингтона (Huntington's disease, HD) использован прецизионный метод анализа посмертного материала посредством

газовой хроматографии/масс-спектрометрии TMS-derivatизированных образцов после предварительной проверки их устойчивости и воспроизводимости [64]. На фоне нарушений гликолиза, ЦТК, полиолового пути и цикла мочевины обнаружено драматическое снижение содержания Pan в большинстве исследованных структур мозга пациентов с HD (47,63 мкмоль/г) по сравнению с контролем (86,8 мкмоль/г) [64]. Анализ изменений в 5 основных кластерах, включающих 63 низкомолекулярных соединения, показал глубокое падение уровня Pan в мозжечке и верхней лобной извилине, а также относительно более низкое содержание в 8 из 12 проанализированных структур мозга (например, сенсорная кора, GP, височная извилина, черная субстанция, гиппокамп). Низкий уровень Pan не был ассоциирован со степенью утраты массы или объёма нервных структур. Степень мутации гена *HTT*, оценённая по биомаркеру *HTT GAG* и накоплению железа в нейроструктурах, также не коррелировали с уровнем витамина B5 [64], равно как не была установлена связь показателя с причинами смерти при HD. Предполагалось потенциальное ослабление биосинтеза CoA у пациентов с HD, как это может иметь место при синдромах PKAN, поскольку характерное для PKAN накопление железа наблюдалось в базальных ганглиях обследованных образцов. По мнению авторов, изменения метаболических профилей при HD отражают чрезвычайную нагрузку на систему AcCoA/CoA (например, через N-ацетилглутаматсинтазу в цикле мочевины) и ЦТК. Вероятность дефекта переносчика пантотеновой кислоты hSMVT, кодируемого геном *SLC5AG*, у пациентов с HD велика, так как диетический дефицит витамина B5 по причине широкого его распространения в продуктах маловероятен [4, 23, 65].

Использование вышеуказанной методологии в исследованиях посмертных образцов мозга пациентов с болезнью Альцгеймера (AD) по сравнению с образцами, аналогичными по возрасту, полу и посмертному времени исследования, выявило падение концентрации Pan с 40,5 (35,8–45,2) в контроле до 17,3 (15,2–19,2) мкмоль/кг при AD, особенно выраженным в структурах наиболее подверженных патологии при AD (гиппокамп, энторинальная кора и средняя височная извилина). В расчёте на цельный мозг падение уровня витамина B5 составило 60% [65]. Метаболомные исследования указывают на схожесть выявленных нарушений с HD и ассоциируются с патохимическими сдвигами в полиольном и гликолитическом путях метаболома. Выдвинута гипотеза,

предполагающая глобальный дефицит Pan в ЦНС при AD, приводящий к нарушению биосинтеза CoA и течения CoA-зависимых (AcCoA-зависимых) метаболических процессов, предопределяющих, вероятно, патогенез деменции. Гипотеза аргументируется данными о низкой активности PDHC и ChAT в головном мозге при AD [65]. Обращается внимание на локализацию Pan в миелиновых структурах белого вещества и необходимость включения препаратов Pan в терапию AD.

Топография распределения Pan в нейроструктурах изучена в эксперименте на крысах иммуногистохимическим методом с применением антисыворотки к витамину B5 и дополнена масс-спектрометрией с индуктивно-связанной плазмой (ISP-MS). Исходя из предположения, что нарушения биодоступности Pan в ЦНС могут проявляться на ранних стадиях нейродегенерации, и сходстве нарушений метаболома при HD и AD и сахарном диабете 2-го типа [64, 66], моделировали стрептозотоциновый диабет у крыс и исследовали иммунофлуоресценцию в хвостатом ядре и мозжечке, т.е. в областях с разной степенью повреждений, характерных для HD [64]. Установлено, что распределение Pan идентично в обеих структурах и не изменяется при диабетической патологии, при том что предыдущее исследование посмертного материала выявило значительное различие такового (~150 мкмоль/кг – в мозжечке и ~60 мкмоль/кг – в хвостатом ядре) [64]. Авторы обращают внимание на участие ацетил-CoA и ацил-CoA в биосинтезе миелина и роли демиелинизации в механизмах возрастных изменений при различных видах нейродегенерации [9, 66]. Это соответствует относительно высокому содержанию Pan в нейроструктурах, отличающихся высокой интенсивностью синтеза миелина [66]. Метаболомные исследования подтвердили возникновение на фоне снижения депонирования Pan в ЦНС при AD активности митохондриальных ферментов – пируватдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы, 2-оксоглутаратдегидрогеназы и сукцинил-CoA-синтетазы, ассоциированных с коферментной формой Pan – CoA [30, 65, 67]. Показано также, что большинство структур мозга пациентов с деменцией при болезни Паркинсона (PD) характеризуется падением концентрации витамина B5, особенно выраженным в мозжечке, чёрной субстанции и продолговатом мозге. Делается концептуальный вывод об избирательном нарушении депонирования Pan в нейроструктурах при разных нейродегенеративных заболеваниях [68].

Исследование CoA-модификации белков и пептидов с использованием моноклонального антитела IF10, связывающегося с CoA, и последующий иммуногистохимический анализ открыли возможность исследования процесса CoA-илирования в посмертных образцах мозга пациентов с NBIA и основными нейродегенеративными заболеваниями. Установлено, что детектируемый иммунореактивный сигнал анти-CoA [34] при NBIA выявляется преимущественно в ядрах нейронов и глии, а также в крупных нейронах серого вещества. Иммунореактивность анти-CoA не проявилась в сером и белом веществе мозга пациентов с множественной системной атрофией мозга (MSA) и прогрессирующим надъядерным параличом (PSP), но наблюдалась в поясной извилине и среднем мозге пациентов с PD, а также в аксонах нейронов базальных ганглиев пациентов с кортикобазальной дегенерацией [69]. Во фронтальной коре мозга пациентов с AD выявлен интенсивный анти-CoA-сигнал, ассоциированный с нитями нейропиля и внутриклеточными нейрофибрилярными клубками (NFT), но анти-CoA-иммунореактивность была характерна для всех областей мозга за исключением базальных ганглиев. Сходный по интенсивности с фронтальной корой сигнал наблюдался в височной коре и гиппокампе. Выявление иммунореактивных сигналов на антитела тау-белка обнаружило совместную локализацию обоих антител в NFT, хотя не установлено частотного совпадения обеих иммунофлуоресцентных меток (среднее количество CoA-позитивных сигналов на м² оказалось 10, а тау-позитивных – 22) [69].

Последующая экспрессия и очистка тау-белков 2NSR и 2N4K, отличающихся локализацией цистеиновых остатков Cys291 и Cys322, но структурно эквивалентных и относительно малореакционных, обнаружили феномен CoA-илирования по остаткам цистеина преимущественно в мономерной форме тау-белка. Параллельные эксперименты на клетках НЕК 293/Pank 1β, сверхэкспрессирующих тау-белок HIS-2N4R, показали, что последний подвергается CoA-илированию при иницировании окислительного стресса диамидом, и при этом наблюдается увеличение димеризации белка. H₂O₂-индуцированная димеризация изоформы 2N3R приводила к образованию межмолекулярной дисульфидной связи, в отличие от изоформы 2N4R, способной к образованию внутримолекулярной дисульфидной связи Cys291 и Cys322. Установлено, что указанная димеризация 2N3R почти полностью ингибируется в присутствии CoA.

Предполагается, что процесс CoA-илирования защищает тау-белок 2NSR от димеризации, вызванной дисульфидообразованием и, следовательно, CoA играет защитную роль против чрезмерного окисления остатков цистеина в тау-белке при окислительном стрессе [69]. Авторы исследования осторожно оценивают роль CoA в защите тау-белка от димеризации, имея в виду сложный характер его участия в регуляции перестройки и пространственной организации микротрубочек, в частности, в ответ на изменения окислительно-восстановительного потенциала и развитие окислительного стресса. При этом тау-белок проявляет собственную активность ацетилтрансферазы и способен к аутоацетилированию после обратимого ингибирования и CoA-модификации. Ацетилирование Lys321, Lys259 и Lys353 ингибирует фосфорилирование Ser324, Ser262 и Ser356 соответственно [69]. Тем самым феномен ацетилирования может быть связан с активированием функции изомеризации тау-белка в формировании цитоскелета. Эта функция может иметь критическое значение при окислительном стрессе, который инициирует сборку полного биосинтетического комплекса ферментов биосинтеза CoA [34] и его непосредственную активацию, сопровождающуюся ростом ацетилирования белков, а также возросшее обеспечение AcCoA ацетилтрансфераз гистонов [7, 10, 30]. Можно полагать, что структурные перестройки микроструктур в ЦНС являются редокс-чувствительными и подвержены воздействию ключевых факторов стабилизации редокс-баланса и механизмов редокс-сигналинга [13, 70].

ВЗАИМОСВЯЗЬ СИСТЕМЫ CoA И ГЛУТАТИОНА В РЕГУЛЯЦИИ РЕДОКС-БАЛАНСА В МОЗГЕ

Нарушения окислительно-восстановительного равновесия играют важную роль в патогенезе нейродегенеративных заболеваний, причём в степени выраженности окислительного стресса имеет значение не только интенсивность образования свободнорадикальных продуктов, но и поддержание редокс-статуса нейроструктур [71, 72]. В головном мозге основным компонентом редокс-баланса является система глутатиона [73, 74]. Концентрация GSH в ткани мозга почти в 400 раз больше, чем в крови. GSH выполняет роль редокс-буфера, нуклеофильной ловушки электрофильных компонентов, регулятора синтеза и репарации ДНК, защитника тиольных групп белков,

стабилизатора клеточных мембран, участвует в детоксикации ксенобиотиков, а также регулирует отдельные сигнальные пути [73–75]. Нарушения системы GSH в мозге наблюдаются в процессе старения и при нейродегенеративных заболеваниях, таких как AD, PD, HD [76–80].

Исследование функциональной связи систем CoA и GSH при окислительном стрессе, непереносимого фактора развития нейродегенеративной патологии, аргументировано не только прямой идентификацией смешанного дисульфида глутатиона и CoA [20, 81], но и выявленным нами деингибированием пантотенаткиназы реакцией дисульфидообразования между CoASH и GSSG [82]. Система биосинтеза CoA характеризуется возможностью образования нескольких редокс-пар (PPCSH/SS, PPanSH/SS, dPCoASH/SS, CoASH/SS, PanSH/SS), каждая из которых может взаимодействовать с основными клеточными тиол-дисульфидными парами (цистеин/цистин, GSH/GSSG и др.) и серосодержащими белками. Эти пары, как и цистеиновые остатки белков, являются мишенями в редокс-сигналинге и возможными эффекторами в поддержании редокс-статуса клеток [83, 84]. Универсальное представительство системы CoA в клеточных системах (разнообразные функции в метаболизме ЦНС) позволяет более широко оценить её вклад в действия редокс-модулирующих соединений и редокс-чувствительных факторов в нейровоспалении, окислительном стрессе и нейродегенерации [19, 83, 84].

Редокс-статус неокортекса и гиппокампа крыс, оцениваемый по соотношению белковых и небелковых тиолов, обнаруживает значительную их модуляцию при введении провоспалительного ФНО α и фрагмента (25–35) A β на фоне разнонаправленных изменений активностей синтазы оксида азота и каспазы-3 [85]. Тиол-дисульфидный статус белков синаптосомальных мембран, подвергнутых воздействию бутионинсульфоксимида и реагента Фентона, характеризовался резким снижением соотношения SH/SS и, напротив, его существенным ростом при инкубации синаптосом с пантотенатом, хотя этот рост уменьшается при воздействии реагента Фентона. Наблюдали аналогичные изменения системы GSH/GSSG и отсутствие эффекта пантотената при инкубации синаптосом с бутионинсульфоксимином, вероятно, в связи с блокированием синтеза GSH, что подтверждается уменьшением активности глутатионредуктазы [86].

Изучение эффектов структурного ингибитора пантотенаткиназной реакции – гомопантотената (GPan) и его композиции с панте-

нолом – на свободнорадикальные процессы и уровень кортикостерона в гиппокампе и неокортексе крыс с интероцептивным стрессом выявило селективную чувствительность гиппокампа к стрессорному воздействию и модуляцию метаболического ответа ингибитором и предшественником биосинтеза CoA. В частности, повторное введение GPan снижало уровень кортикостерона и увеличивало уровень метаболитов NO в сыворотке крови, а также увеличивало их содержание в гиппокампе. Эти эффекты нивелировались при сочетанном введении GPan и пантенола [87].

Детально изучена роль предшественников биосинтеза CoA в характере поведенческих реакций, стабилизации системы CoA и GSH в гиппокампе и больших полушариях мозга в модели амнезии, индуцированной скополламином, у крыс, предварительно получавших модулятор глутаматергической системы мемантин. Негативное влияние скополамина на память подопытных животных сопровождалось снижением содержания GSH и CoA, а предварительное воздействие композиции мемантина с PL или пантотенатом кальция способствовало улучшению памяти и нормализации уровня CoA в гиппокампе. Одновременное исследование редокс-статуса глутатиона и белков больших полушарий мозга выявило роль глутатионредуктазной и глутатионтрансферазной реакций в стабилизации редокс-ландшафта ЦНС при моделировании амнезии и существенную роль системы биосинтеза CoA в потенцировании эффекта мемантина. Предполагается, что антагонистический эффект скополамина и мемантина, опосредованный мускариновыми рецепторами ACh (mAChR) и глутамата (NMDAR), вовлекает процесс модуляции редокс-статуса нейроструктур и подвержен воздействию предшественников биосинтеза CoA [88].

Устойчивость системы CoA в ЦНС при моделировании нейродегенеративной патологии [9, 16] была преодолена сочетанным воздействием *in vivo* системного воспаления (бактериальный липополисахарид) и нейротоксического фактора (хлористый алюминий). На 14-й день эксперимента в больших полушариях головного мозга и в гиппокампе наблюдали уменьшение суммарных фракций CoA с $109,5 \pm 4,8$ до $88,5 \pm 4,6$ нмоль/г и с $102,5 \pm 5,1$ до $82,5 \pm 4,7$ нмоль/г соответственно. Синхронно снижалась фракция CoASH, как и обе фракции в печени крыс. При стабильной активности пантотенаткиназы (печень) биотрансформация [^3H] Pan в Ppan и CoA снижалась, что предполагает роль механизмов

транспорта Pan (и метаболитов), и/или дисбаланс ферментов биосинтеза CoA при нейротоксическом воздействии [89].

Характерные признаки нейродегенеративных заболеваний – это нарушения фолдинга белков и образование белковых агрегатов. Образование дисульфидных связей является критическим моментом в фолдинге и поддержании трёхмерной конформации многих белков [75]. В свою очередь, специфические белки, образующиеся при определённых видах нейродегенеративных патологий, могут влиять на функции митохондрий. Введение животным с моделью PD ксенобиотического предшественника CoA (PL) приводит к снижению содержания продуктов свободнорадикального окисления, уменьшению нарушений окислительного фосфорилирования и восстановлению тиол-дисульфидного баланса в мозге. При совместном введении PL с предшественником биосинтеза глутатиона N-ацетилцистеином (NAC) и наноселеном корригирующее действие пантенола усиливается [90].

Развитие окислительного стресса и выраженных нарушений тиол-дисульфидного баланса, включая систему глутатиона, сопряжённых с падением уровня CoA в больших полушариях мозга крыс при поступлении в организм карбонильного железа или бактериального липополисахарида, оценивали как патогенетические механизмы нейровоспаления и нейродегенерации [91]. Защитный эффект в отношении предупреждения окислительного стресса, нейровоспаления и нарушений редокс-статуса нейроструктур при моделировании PD и HD наблюдали при введении PL и его композиций с NAC и сукцинатом [90, 92]. Развитие наших предыдущих исследований [89] на модели алюминиевого нейротоксикоза, квалифицированного как альтернативная экспериментальная модель AD [93], показало, что он является патогномичной моделью дефицита CoA в ЦНС.

В структурах головного мозга крыс при алюминиевом нейротоксикозе происходит снижение содержания уровня GSH и уменьшение соотношения GSH/GSSG в больших полушариях, гиппокампе и базальных ганглиях [94]. На этом фоне усиливаются процессы S-глутатионилирования белков, наблюдается торможение его биосинтеза [94, 95]. Активация биосинтеза CoA посредством введения его предшественников PL и D-пантетина, но не гомопантотената, на фоне действия хлорида алюминия приводит к ослаблению явлений окислительного стресса и восстановлению тиол-дисульфидного баланса и системы глутатиона [94].

По-видимому, происходящий на фоне алюминиевого нейротоксикоза, сдвиг редокс-баланса за счёт изменений тиол-дисульфидного статуса системы GSH может быть связан с ослаблением интенсивности реакций ЦТК, образованием AcCoA и одновременной активацией дегидрогеназ пентозофосфатного пути, усилением образования NADPH⁺ для биосинтеза глутатиона [96]. Снижение активности ферментов ЦТК, характерное для нейродегенеративной патологии, может быть связано с посттрансляционной модификацией ферментов ЦТК, глутатионилированием [97], что влечёт нарушения взаимодействия компонентов мультиферментного комплекса [35, 70]. Выраженное защитное действие в отношении процессов перекисного окисления липидов и редокс-потенциала системы GSH обнаруживается при введении в состав корригирующей композиции NAC, предшественника глутатиона. Комбинация NAC + PL + сукцинат снижает образование свободнорадикальных продуктов и способствует восстановлению редокс-потенциала системы глутатиона и уровня S-глутатионилированных белков до значений в контрольных пробах [98].

Полученные нами результаты свидетельствуют, что воздействие нейротоксических факторов приводит к нарушению системы глутатиона, и применение предшественников биосинтеза CoA в значительной мере стабилизирует редокс-баланс в нейроструктурах, прежде всего, восстанавливая пул глутатиона. Возможные механизмы взаимосвязи систем CoA и GSH могут включать активирование глутатионсинтетазы, альтернативное деглутатионилирование белков, уменьшение его экстраклеточного экспорта и тиол-дисульфидного взаимодействия [84, 97, 99]. В механизмах нейропротекции столь же очевидно участие системы CoA, AcCoA, в особенности ацил-CoA, в синтезе и метаболизме миелина, структурных белков цитоскелета и формировании редокс-ландшафта холинергической системы.

ВОЗМОЖНОСТЬ ЦЕЛЕВОЙ КОРРЕКЦИИ СИСТЕМЫ CoA ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

В 1980–1990-е гг. было проведено доклиническое изучение (фармакологические и фармакокинетические свойства, коферментная активность) следующих производных Pan: PPan, PL, PanSS, сульфо-PanSH, гомо-Pan (GPan) и дисульфидной формы CoA, полученной в результате микробиосинтеза [24, 29, 100, 101].

Осуществлено клиническое изучение препаратов Pan, PanSS, PL и GPan, в том числе как детоксикационных и нейропротекторных средств, при ишемической, алкогольной патологии и в лечении инволюционных психозов [24, 100, 102, 103].

Устранение дефицита Pan в организме пациентов с основными нейродегенеративными заболеваниями, сопровождающегося снижением депонирования витамина в нейроструктурах [64, 65, 67], с вероятным нарушением системы CoA и метаболома ацил-CoA, а также коррекция системы биосинтеза CoA представляется целевым патогенетическим подходом. Поиск эффективных технологий является актуальной задачей и включает подходы с направленной экспрессией ферментов биосинтеза CoA (пантозин), применение соединений Pan с высокой проницаемостью гематоэнцефалического барьера или разработку лекарственных форм 4'-фосфопантетеина (4',4"-дифосфопантетина), их S-ацилов как соединений с чрезвычайно высокой биодоступностью [9, 29, 62]. Совершенно не изучен комплексный подход коррекции пула Pan в организме, включающий метаболизм витаминов в биоценозе кишечника, например, при использовании S-сульфопантетеина и его метаболитов [4, 29]. Не исчерпаны возможности изучения D-пантенола в неврологической клинике, хотя его фармакокинетические свойства и фармакологическая активность

могут быть оценены достаточно высоко [24, 44, 92, 98]. Равным образом необходимо реализовать накопленный опыт контроля уровня CoA в периферических клетках крови [102–104], чему может способствовать развивающаяся методология исследований в этой области коферментологии. Вероятно, можно прогнозировать комплексное воздействие на системы CoA/ацил-CoA и редокс-код ЦНС при нейродегенеративной патологии, что включает, наряду с предшественниками биосинтеза CoA, редокс-фармакологические средства и направленную коррекцию пути транссульфирования [105], обеспечивающего митохондриальный гомеостаз, пулы цистеина/цистина и глутатиона, ассоциированные с системой CoA.

Вклад авторов. Мойсеёнок А.Г. – формирование концепции обзора, подготовка текста введения, первого, второго, третьего (совместно с Канунниковой Н.П.), четвертого разделов и заключения; Канунникова Н.П. – участие в подготовке третьего раздела и заключения, подготовка пятого раздела, составление литературного указателя и резюме.

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. Мойсеёнок А. Г. (2019) 2018 – год юбилеев в изучении пантотеновой кислоты и CoA, *Биохимия и мол. биология, сб. науч. тр.*, Минск, **3**, 87-89.
2. Nachmansohn, D. (1959) *Chemical and Molecular Basis of Nerve Activity*, Academic Press, New York and London.
3. Decker, K. (1959) *Die aktivierte Essigsäure. Das Coenzym A und seine Acylderivate in Stoffwechsel der Zelle*, Stuttgart.
4. Мойсеёнок А. Г. (1980) *Пантотеновая кислота (биохимия и применение витамина)*, Минск, Наука и техника.
5. Leonardi, R., Zhang, Y.-M., and Rock, C. O. (2005) Coenzyme A: back in action, *Progr. Lipid Res.*, **44**, 125-153, doi: 10.1016/j.plipres.2005.04.001.
6. Naqueta, P., Kerrb, E.W., Vickersb, S. D., and Leonardi, R. (2020) Regulation of coenzyme A levels by degradation: the 'Ins and Outs', *Progress in Lipid Res.*, **78**, 101028, doi: 10.1016/j.plipres.2020.101028.
7. Czumaj, S., Szrok-Jurga, A., Hebanowska, J., Turyn, J., Swierczynski, T., Sleszynski, T., and Stelmanska, E. (2020) The pathophysiological role of CoA, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 9057, doi: 10.3390/ijms21239057.
8. Yu, Y., Moretti, I. F., Grzeschik, N. A., Sibon, O. C. M., and Schepers, H. (2021) Coenzyme A levels influence protein acetylation, CoAlation and 4' phosphopantetheinylation: expanding the impact of a metabolic nexus molecule, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.*, **1868**, 118965, doi: 10.1016/j.bbamcr.2021.118965.
9. Mignani, L., Gnutti, B., Zizioli, D., and Finazzi, D. (2021) Coenzyme A biochemistry: from neurodevelopment to neurodegeneration, *Brain Sci.*, **11**, 1031, doi: 10.3390/brainsci11081031.
10. Dobrzyn, P. (2022) CoA in health and disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 4371. doi: 10.3390/ijms23084371.
11. Wieland, O. (1966) Oxydo-Reductasen. Coenzym A-enzyme/Hoppe-Seyler/Thierfelder, *Handbuch der Physiologisch- und Pathologisch-Chemischen Analyse*, **10**, Aufl., Bd. VI/B., 1-181.
12. Abiko, Y. (1975) *Metabolism of coenzyme A*, Metabolic Pathway (Greenberg, D.S., ed) Academic Press, New York.

13. Мойсеёнок А. Г., Гуринович В. А., Катковская И. Н., Лукиенко Е. П., Максимчик Ю. З. (2022) Кофермент А – модулирующий компонент развития окислительного и метаболического стресса в структурах ЦНС, *Кислород и свободные радикалы*, сб. мат., Гродно, ГрГМУ, стр. 116-118.
14. Zhou, B., Westaway, S., Levinson, B., Johnson, M., Gitschier, J., and Hayflick, S. (2001) A novel gene (PANK2) is defective in Hallervorden-Spatz syndrome, *Nat. Genet.*, **28**, 345-349, doi: 10.1038/ng572.
15. Dusi, S., Valletta, L., Haack, T. B., Tsuchiya, Yu., Venco, P., Pasqualato, S., Goffrini, P., Tigano, M., Demchenko, N., Wieland, T., Schwarzmayr, T., Strom, T., Invernizzi, F., Garavaglia, B., Gregory, A., Sanford, L., Hamada, J., Bettencourt, C., Houlden, H., Chiapparini, L., Zorzi, G., Kurian, M. A., Nardocci, N., Prokisch, H., Hayflick, S., Gout, I., and Tiranti, V. (2014) Exome sequence reveals mutations in CoA Synthase as a cause of neurodegeneration with brain iron accumulation, *Am. J. Hum. Genet.*, **94**, 11-22, doi: 10.1016/j.ajhg.2013.11.008.
16. Hayflick, S. J. (2014) Defective pantothenate metabolism and neurodegeneration, *Biochem. Soc. Trans.*, **42**, 1063-1068, doi: 10.1042/BST20140098.
17. Moiseenok, A. G., Komar, V. I., Khomich, T. I., Kanunnikova, N. P., and Slyshenkov, V. S. (2000) Pantothenic acid in maintaining thiol and immune homeostasis, *Bio Factors*, **11**, 53-55, doi: 10.1002/biof.5520110115.
18. Slyshenkov, V., Rakovska, M., Moiseenok, A., and Wojtczak, L. (1995) Pantothenic acid and its derivatives protect Ehrlich as cites tumor cells against lipid peroxidation, *Free Radic. Biol. Med.*, **19**, 767-772, doi: 10.1016/0891-5849(95)00084-b.
19. Гуринович В. А., Семенович Д. С., Катковская И. Н., Канунникова Н. П., Мойсеёнок А. Г. (2019) Тиол-дисульфидный статус системы КоА при моделировании системного воспаления и введении редокс-модулирующих соединений, *Актуал. вопросы физиол.*, сб. м. (ред. В. В. Зинчук.), Гродно, ГрГМУ, стр. 84-87.
20. Lushchak, V. I. (2012) Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions, *J. Amino Acids*, **2012**, 736837, doi: 10.1155/2012/736837.
21. Мойсеёнок А. Г. (2019) Биосинтез и редокс-активность CoA – механизмы биологической и фармакологической активности производных пантотеновой кислоты, *Биохимия и мол. биология, сб. науч. тр.* (ред. колл., Семененя И. Н., Мойсеёнок А. Г. и др.), Минск, ИВЦ Минфина, **3**, 91-93.
22. Tsuchiya, Y., Peak-Chew, S. Y., Newell, C., Miller-Aidoo, S., Mangal, S., Zhyvoloup, A., Bakovic, J., Malanchuk, O., Pereira, G. C., Kotiadis, V., Szabadkai, G., Duchon, M. R., Campbell, M., Cuenza, S. R., Vidal-Puig, A., James, A. M., Murohy, M. P., Filonenko, V., Skehel, M., and Gout, I. (2017) Protein CoAlation: a redox-regulated protein modification by coenzyme A in mammalian cells, *Biochem. J.*, **474**, 2489-2508, doi: 10.1042/BCJ20170129.
23. Башун Н. З., Рагин П. В., Мойсеёнок А. Г. (2020) *Неинвазивные методы исследования пищевого статуса*, ГрГУ им. Янки Купалы, Гродно.
24. Мойсеёнок А. Г. (отв. ред.) (1998) *Пантенол и другие производные пантотеновой кислоты: биохимия, фармакология и медицинское применение*, мат. межлун. симп. НАН Беларуси, Институт биохимии, Гродно.
25. Prohaska, R., Sibon, O. C. M., Rudnicki, D. D., Danek, A., Hayflick, S. J., Verhaag, E. M., Vonk, J. J., Margolis, R. L., and Walker, R. H. (2012) Brain, blood, and iron: perspectives on the roles of erythrocytes and iron in neurodegeneration, *Neurobiol. Dis.*, **46**, 607-624, doi: 10.1016/j.nbd.2012.03.006.
26. Jackowski, S., and Rock, C. O. (1981) Regulation of coenzyme A biosynthesis, *J. Bacteriol.*, **148**, 926-932, doi: 10.1128/jb.148.3.926-932.1981.
27. Jackowski, S. (1996) Biosynthesis of pantothenic acid and coenzyme A, in *Escherichia coli and Salmonella typhimurium: Cellular and Molecular Biology* (Neidhardt, F. C., Curtiss, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Low, K. B., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M., and Umberger, H. E., eds) Washington, D.C., pp. 687-694.
28. Zhyvoloup, A., Nemazanyy, I., Panasyuk, G., Valovka, T., Fenton, T., Rebholz, H., Wang, M. L., Foxon, R., Lyzogubov, V., Usenko, V., Куямова, R., Gorbenko, O., Matsuka, G., Filonenko, V., and Gout, I. T. (2003) Subcellular localization and regulation of coenzyme A synthase, *J. Biol. Chem.*, **278**, 50316-50321, doi: 10.1074/jbc.M307763200.
29. Мойсеёнок А. Г., Копелевич В. М., Шейбак В. М., Гуринович В. А. (1989) *Производные пантотеновой кислоты. Разработка новых витаминных и фармакотерапевтических средств* (под ред. В. И. Гунара и П. И. Лукиенко) Минск, Наука и техника, стр. 216.
30. Jankowska-Kulawy, A., Klimaszewska-Łata, J., Gul-Hinc, S., Ronowska, A., and Szutowicz, A. (2022) Metabolic and cellular compartments of acetyl-CoA in the healthy and diseased brain, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 10073, doi: 10.3390/ijms231710073.
31. Fernandes, R. F., and Ellisa, J. M. (2020) Acyl-CoA synthetases as regulators of brain phospholipid acylchain diversity, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, **161**, 102175, doi: 10.1016/j.plefa.2020.102175.
32. Orsatti, L., Orsale, M. V., Pasquale, P., Vecchi, A., Colaceci, F., Ciammaichella, A., Rossetti, I., Bonelli, F., Baumgaertel, K., Liu, K., Elbaum, D., and Monteagudo, E. (2021) Turnover rate of coenzyme A in mouse brain and liver, *PLoS One*, **16**, e0251981, doi: 10.1371/journal.pone.0251981.
33. Yang, H., Zhao, C., Tang, M. C., Wang, Y., Wang, S. P., Allard, P., Furtos, A., and Mitchell, G. A.

- (2019) In born errors of mitochondrial acyl-coenzyme a metabolism: Acyl-CoA biology meets the clinic, *Mol. Genet. Metab.*, **128**, 30-44, doi: 10.1016/j.yimgme.2019.05.002.
34. Malanchuk, O. M., Panasyuk, G. G., Serbin, N. M., Gout, I. T., and Filonenko, V. V. (2015) Generation and characterization of monoclonal antibodies specific to Coenzyme A, *Biopolym. Cell*, **31**, 187-192, doi: 10.7124/bc.0008DF.
 35. Baković, J., Martínez, D. L., Nikolaou, S. Yu, Tossounian, M.-A., Tsuchiya, Y., Thrasivoulou, C., Filonenko, V., and Gout, I. (2021) Regulation of the CoA biosynthetic complex assembly in mammalian cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 1131, doi: 10.3390/ijms22031131.
 36. Deutsch, J., Rapoport, S. I., and Purdon, A. D. (1997) Relation between free fatty acid and acyl-CoA concentrations in rat brain following decapitation, *Neurochem. Res.*, **22**, 759-765, doi: 10.1023/a:1022030306359.
 37. Bielarczyk, H., and Szutowicz, A. (1989) Evidence for the regulatory function of synaptoplasmic acetyl-CoA in ACh synthesis in nerve endings, *Biochem. J.*, **262**, 337-380, doi: 10.1042/bj2620377.
 38. Мойсеёнок А. Г., Гуринович В. А., Омелянчик С. Н., Слышенков В. С. (2004) Биосинтез кофермента А как универсальный механизм сопряженности экзогенности и множественности функций пантотеновой кислоты, *Укр. Биохим. Журн.*, **76**, 68-81.
 39. Spector, R., and Boose, B. (1984) Accumulation of pantothenic acid by the isolated choroid plexus and brain slices *in vitro*, *J. Neurochem.*, **43**, 472-478, doi: 10.1111/j.1471-4159.1984.tb00923.x.
 40. Spector, R., Sivesind, C., and Kinzenbaw, D. (1986) Pantothenic acid transport through the blood-brain barrier, *J. Neurochem.*, **47**, 966-971, doi: 10.1111/j.1471-4159.1986.tb00705.x.
 41. Мойсеёнок А. Г., Гуринович В. А., Катковская И. Н., Бадун Г. А., Гуляева Н. В. (2008) Биотрансформация предшественников биосинтеза кофермента А в структурах мозга, *Вестн НАН Беларуси Сер. Мед. Наук*, **4**, 48-54.
 42. Мойсеёнок А. Г., Гуринович В. А., Евкович И. Н., Бадун Г. А., Тясто З. А., Степаничев М. Ю., Лазарева Н. А., Онуфриев М. В., Гуляева Н. В. (2007) Синтез 4'-[³H]-фосфо-пантотеновой кислоты и исследование ее метаболизма в структурах головного мозга, *Нейрохимия*, **24**, 211-217.
 43. Мойсеёнок А. Г., Катковская И. Н., Гуринович В. А., Денисов А. А., Пашкевич С. Г., Кульчицкий В. А. (2010) Поглощение и биотрансформация предшественника биосинтеза КоА D-пантетина в гиппокампе белых крыс, *Нейрохимия*, **27**, 286-293.
 44. Гуринович В. А., Евкович И. Н., Бадун Г. В., Мойсеёнок А. Г. (2006) Распределение и биотрансформация [³H]-D-пантенола в отделах головного мозга в норме и при моделировании алюминиевого нейротоксикоза, *Вестн НАН Беларуси Сер. Мед. Наук*, **3**, 66-72.
 45. Ferreira-Vieira, T. H., Guimaraes, I. M., Silva, F. R., and Ribeiro, F. M. (2016) Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system, *Curr. Neuropharmacol.*, **14**, 101-115, doi: 10.2174/1570159x13666150716165726.
 46. Ronowska, A., Szutowicz, A., Bielarczyk, H., Gul-Hic, S., Klimaszewska-Łata, A., Dys, A., Zysk, M., and Jankowska-Kulaw, A. (2018) The regulatory effects of acetyl-CoA distribution in the healthy and diseased brain, *Front. Cell Neurosci.*, **12**, 169-189, doi: 10.3389/fncel.2018.00169.
 47. Szutowicz, A., Bielarczyk, H., Zyśk, M., Dyś, A., Ronowska, A., Gul-Hinc, S., and Klimaszewska-Łata, J. (2017) Early and late pathomechanisms in Alzheimer's disease: from zinc to amyloid-β neurotoxicity, *Neurochem. Res.*, **42**, 891-904, doi: 10.1007/s11064-016-2154-z.
 48. Zhou, Q., Lam, P. Y., Han, D., and Cadenas, E. (2009) Activation of c-jun-N-terminal kinase and decline of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity during brain aging, *FEBS Lett.*, **583**, 1132-1140, doi: 10.1016/j.febslet.2009.02.043.
 49. Chételat, G., Arbizu, J., Barthel, H., Garibotto, V., Law I., Morbelli, S., van de Giessen, E., Agosta, F., Barkhof, F., Brooks, D. J., Carrillo, M., Dubois, B., Fjell, A. M., Frisoni, J. B., Hansson, O., Herholz, K., Hutton, B., Clifford, R. J., Lammertsma, A., Landau S., Minoshima, S., Nobili, F., Nordberg, A., Ossenkoppele, R., Oyen, W. J., Perani, D., Rabinovici, G. D., Scheltens, Ph., Villemagne, V., Zetterberg, H., and Drzezga, A. (2020) Amyloid-PET and 18 F-FDG-PET in the diagnostic investigation of Alzheimer's disease and other dementias, *Lancet Neurol.*, **19**, 951-962, doi: 10.1016/S1474-4422(20)30314-8.
 50. Westergaard, N., Waagepetersen, H. S., Belhage, B., and Schousboe, A. (2017) Citrate, a ubiquitous key metabolite with regulatory function, *Neurochem. Res.*, **42**, 1583-1588, doi: 10.1007/s11064-016-2159-7.
 51. Currais, A., Huang, L., Goldberg, J., Petrascheck, M., Ates, G., Pinto-Duarte, A., Shokhirev, M., Schubert, D., and Maher, P. (2019) Elevating acetyl-CoA levels reduces aspects of brain aging, *Elife*, **8**, e47866, doi: 10.7554/eLife.47866.
 52. Simpson, I. A., Carruthers, A., and Vannucci, S. J. (2007) Supply and demand in cerebral energy metabolism: the role of nutrient transporters, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **27**, 1766-1791, doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600521.
 53. Mattson, M. P., Moehl, K., Ghena, N., Schmaedick, M., and Cheng, A. (2018) Intermittent metabolic switching, neuroplasticity and brain health, *Nat. Rev. Neurosci.*, **19**, 63-80, doi: 10.1038/nrn.2017.156.
 54. Andersen, J. V., Westi, E. W., Jakobsen, E., Urruticoechea, N., Borges, K., and Aldana, B. I. (2021) Astrocyte metabolism of the medium-chain fatty acids octanoic acid and decanoic acid promotes

- GABA synthesis in neurons via elevated glutamine supply, *Mol. Brain*, **14**, 132, doi: 10.1186/s13041-021-00842-2.
55. Bradshaw, P. C. (2021) Acetyl-CoA metabolism and histone acetylation in the regulation of aging and lifespan, *Antioxidants*, **10**, 572, doi: 10.3390/antiox10040572.
 56. Dobrzyn, P., Bednarski, T., and Dobrzyn, A. (2015) Metabolic reprogramming of the heart through stearoyl-CoA desaturase, *Prog. Lipid Res.*, **57**, 1-12, doi: 10.1016/j.plipres.2014.11.003.
 57. Venco, P., Dusi, S., Valletta, L., and Tiranti, V. (2014) Alteration of the coenzyme A biosynthetic pathway in neurodegeneration with brain iron accumulation syndromes, *Biochem. Soc. Trans.*, **42**, 1069-1074, doi: 10.1042/BST20140106.
 58. Vranken, J. G., Jeong, M. Y., Wei, P., Chen, Y. C., Gygi, S. P., Winge, D. R., and Rutter, J. (2016) The mitochondrial acyl carrier protein (ACP) coordinates mitochondrial fatty acid synthesis with iron sulfur cluster biogenesis, *Elife*, **5**, e17828, doi: 10.7554/eLife.17828.
 59. Werning, M., Müllner, E.W., Mlynek, G., Dobretzberger, V., Djinic-Carugo, K., Baron, D. M., Prokisch, H., Büchner, B., Klopstock, T., and Salzer, U. (2020) PKAN neurodegeneration and residual PANK2 activities in patient erythrocytes, *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, **7**, 1340-1351, doi: 10.1002/acn3.51127.
 60. Chang, X., Zhang, J., Jiang, Y., Yao, B., Wang, J., and Wu, Y. (2020) Pilot trial on the efficacy and safety of pantethine in children with pantothenate kinase-associated neurodegeneration: a single-arm, open-label study, *Orphanet. J. Rare Dis.*, **15**, 248, doi: 10.1186/s13023-020-01530-5.
 61. Klopstock, T., Videnovic, A., Bischoff, A. T., Bonnet, C., Cif, L., Comella, C., Correa-Vela, M., Escolar, M. L., Fraser, J. L., Gonzalez, V., Hermanowicz, N., Jech, R., Jinnah, H. A., Kmiec, T., Lang, A., Martí, M. J., Mercimek-Andrews, S., Monduy, M., Nimmo, G. A. M., Perez-Dueñas, B., Pfeiffer, H. C. V., Planellas, L., Roze, E., Thakur, N., Tochen, L., Vanegas-Arroyave, N., Zorzi, G., Burns, C., and Greblikas, F. (2021) Fosmetpantotenat randomized controlled trial in Pantothenate kinase-associated neurodegeneration, *Mov. Disord.*, **36**, 1342-1352, doi: 10.1002/mds.28392.
 62. Sharma, K. L., and Jackowski, S. (2018) A therapeutic approach to pantothenate kinase associated neurodegeneration, *Nat. Commun.*, **9**, 4399, doi: 10.1038/s41467-018-06703-2.
 63. Lin, P., Li, J., Liu, Q., Mao, F., Li, J., Qiu, R., Hu, H., Song, Y., Yang, Y., Gao, G., Yan, C., Yang, W., Shao, C., and Gong, Y. (2008) A missense mutation in SLC33A1, which encodes the acetyl-CoA transporter, causes autosomal-dominant spastic paraplegia (SPG42), *Am. J. Hum. Genet.*, **83**, 752-759, doi: 10.1016/j.ajhg.2008.11.003.
 64. Patassini, S., Begley, P., Xu, J., Church, S. J., Reid, S. J., Waldvogel, H. J., Faull, R. L. M., Snell, R. G., Unwin, R. D., and Cooper, G. J. S. (2019) Cerebral vitamin B5 (D-pantothenic acid) deficiency as a potential cause of metabolic perturbation and neurodegeneration in Huntington's disease, *Metabolites*, **9**, 113, doi: 10.3390/metabo9060113.
 65. Xu, J., Patassini, S., Begley, P., Church, S., Waldvogel, H. J., Faull, R., Unwin, R., and Cooper, G. (2020) Cerebral deficiency of vitamin B5 (D-pantothenic acid; pantothenate) as a potentially-reversible cause of neurodegeneration and dementia in sporadic Alzheimer's disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **527**, 676-681, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.05.015.
 66. Ismail, N., Kureishy, N., Church, S. J., Scholefield, M., Unwin, R. D., Xu, J., Patassini, S., and Cooper, G. (2020) Vitamin B5 (D-pantothenic acid) localizes in myelinated structures of the rat brain: potential role for cerebral vitamin B5 stores in local myelin homeostasis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **552**, 220-225, doi: 10.1016/j.bbrc.2019.11.052.
 67. Sang, C., Philbert, S. A., Hartland, D., Unwin, R. D., Dowsey, A. W., Xu, J., and Cooper, G. (2022) Coenzyme A-dependent tricarboxylic acid cycle enzymes are decreased in Alzheimer's disease consistent with cerebral pantothenate deficiency, *Front. Aging Neurosci.*, **14**, 893159, doi: 10.3389/fnagi.2022.893159.
 68. Scholefield, M., Church, S. J., Xu, J., Patassini, S., Hooper, N. M., Unwin, R. D., and Cooper, G. (2021) Substantively lowered levels of pantothenic acid (Vitamin B5) in several regions of the human brain in Parkinson's disease dementia, *Metabolites*, **11**, 569, doi: 10.3390/metabo11090569.
 69. Lashley, T., Tossounian, M.-A., Heaven, N. C., Wallworth, S., Peak-Chew, S., Bradshaw, A., Cooper, J., de Silva, R., Srai, S. K., Malanchuk, O., Filonenko, V., Koopman, M. B., Rudiger, S., Skehel, M., and Gout, I. (2021) Extensive anti-CoA immunostaining in Alzheimer's disease and covalent modification of tau by a key cellular metabolite coenzyme A, *Front. Cell Neurosci.*, **15**, 739425, doi: 10.3389/fncel.2021.739425.
 70. Martinez-Banaclocha, M. (2022) N-Acetyl-cysteine: modulating the cysteine redox proteome in neurodegenerative diseases, *Antioxidants (Basel)*, **11**, 416, doi: 10.3390/antiox11020416.
 71. Kim, G. H., Kim, J. I., Rhie, S. J., and Yoon, S. (2015) The role of oxidative stress in neurodegenerative diseases, *Exp. Neurobiol.*, **24**, 325-340, doi: 10.5607/en.2015.24.4.325.
 72. Sies, H. (2015) Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine, *Redox Biol.*, **4**, 180-183, doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002.
 73. McBean, G. J., Aslan, M., Griffiths, H. P., and Torrao, R. C. (2015) Thiol redox homeostasis in neurodegenerative disease, *Redox Biol.*, **5**, 186-194, doi: 10.1016/j.tedox.2015.04.004.

74. Forman, H. J. (2016) Glutathione – from antioxidant to post-translational modifier, *Arch. Biochem. Biophys.*, **595**, 64–67, doi: 10.1016/j.abb.2015.11.019.
75. Канунникова Н. П., Семенович Д. С., Мойсеёнок А. Г. (2017) Основные редокс-пары поддержания тиол-дисульфидного баланса в нервной ткани, *Новости Мед.-Биол. Наук*, **15**, 84–89.
76. Smeyne, M., and Smeyne, R. J. (2013) Glutathione metabolism and Parkinson's disease, *Free Radic. Biol. Med.*, **62**, 13–25, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.001.
77. Gu, F., Chauhan, V., and Chauhan, A. (2015) Glutathione redox imbalance in brain disorders, *Clin. Nutr. Metab. Care*, **18**, 89–95, doi: 10.1097/MCO.000000000000134.78.
78. Канунникова Н. П. (2018) Изменения тиол-дисульфидного баланса при болезни Паркинсона, *Вестн НАН Беларуси Сер. Мед. Наук*, **15**, 108–118.
79. Liu, Z., Zhou, T., Ziegler, A. C., Dimitrion, P., and Zuo, L. (2017) Oxidative stress in neurodegenerative diseases: from molecular mechanisms to clinical applications, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, 2525967, doi: 10.1155/2017/2525967.
80. Cha, S. J., Kim, H., Choi, H.-J., Lee, S., and Kim, K. (2017) Protein glutathionylation in the pathogenesis of neurodegenerative diseases, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, 1–9, doi: 10.1155/2017/2818565.
81. Dyar, R. E., and Wilken, D. R. (1972) Rat liver levels of coenzyme A-glutathione and of enzymes in its metabolism, *Arch. Biochem. Biophys.*, **153**, 619–626, doi: 10.1016/0003-9861(72)90381-5.
82. Мойсеёнок А. Г., Хомич Т. И., Резяпкин В. И. (1988) Восстановление активности пантотенаткиназы низкомолекулярными дисульфидами, *Докл. Акад. наук СССР*, **300**, 485–487.
83. Мойсеёнок А. Г. (2003) Пантотеновая кислота: от универсального распространения к универсальным функциям, *Биохимия, фармакология и клиническое применение производных пантотеновой кислоты*, сб. науч. ст. (ред. А. Г. Мойсеёнок), Гродно, стр. 107–113.
84. Мойсеёнок А. Г. (2018) Опосредованный коферментом А универсальный механизм реализации редокс-модулирующего и антиоксидантного потенциала клетки, *Кислород и свободные радикалы*, сб. матер. науч.-практ. конф. с междунар. уч. (ред. В. В. Зинчук), Гродно: ГрГМУ, стр. 137–142.
85. Степаничев М. Ю., Онуфриев М. В., Моисеева Ю. В. (2006) Влияние фактора некроза опухоли альфа- и бета-амилоидного пептида (25–35) на показатели свободнорадикального окисления и активность каспазы-3 в мозге крыс, *Нейрохимия*, **23**, 217–222.
86. Слышенков В. С., Шевалье А. А., Мойсеёнок А. Г. (2006) Предупреждение пантотенатом нарушений системы глутатиона синапсом и функционального состояния синапсосомальной мембраны при окислительном стрессе, *Нейрохимия*, **23**, 313–317.
87. Степаничев М. Ю., Онуфриев М. В., Пискунов А. К., Моисеева Ю. В., Лазарева Н. А., Мойсеёнок А. Г., Гусев П. В., Гуляева Н. В. (2013) Эффекты производных пантотеновой кислоты на свободнорадикальные процессы и уровень кортикостерона в гиппокампе и неокортексе крыс при интероцептивном стрессе, *Нейрохимия*, **30**, 152–157.
88. Степаничев М. Ю., Марков Д. А., Фрейман С. В., Фролова С. В., Омелянчик С. Н., Бородина Т. А., Новикова М. Р., Канунникова Н. П., Онуфриев М. В., Мойсеёнок А. Г., Гуляева Н. В. (2016) Производные пантотеновой кислоты при применении с мемантином снижают вызванную скополамином амнезию у крыс: участие редокс-состояния тиолов и кофермента А, *Нейрохимия*, **33**, 128–139.
89. Мойсеёнок, А. Г., Омелянчик, С. Н., Гуринович, В. А., Евкович, И. Н., Петухова, Т. П. (2005) Система биосинтеза CoA при интоксикации липополисахаридом и хлористым алюминием, *Новости Мед.-Биол. Наук*, **1**, 51–55.
90. Семенович Д. С., Лукиенко Е. П., Канунникова Н. П. (2021) Модуляция показателей окислительного стресса и тиол-дисульфидного баланса в структурах мозга производными пантотеновой кислоты в экспериментальной модели болезни Паркинсона, *Нейрохимия*, **38**, 21–28, doi: 10.31857/S102781332101012X.
91. Семенович Д. С., Канунникова Н. П., Лукиенко Е. П., Бородина Т. А., Омелянчик С. Н., Филипович Н. А., Гуринович В. А., Мойсеёнок А. Г. (2016) Модуляция системы биосинтеза CoA и тиол-дисульфидный баланс в больших полушариях мозга крыс при системном воспалении и насыщении железом, *Вестник ГрДУ імя Я. Купалы. Сер. 5. Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія*, **6**, 140–147.
92. Semenovich, D. S., Lukiyenko, E. P., Titko, O. V., and Kanunnikova, N. P. (2018) Panthenol and succinate as modulators of changes of redox balance and energy metabolism in the experimental model of Parkinson's disease, *Indian J. Appl. Res.*, **8**, 436–438.
93. Nobakht, M., Hoseini, S. M., Mortazavi, P., Sohrabi, I., Esmailzade, B., Rooshandel, N., and Omidzahir, S. (2011) Neuropathological changes in brain cortex and hippocampus in a rat model of Alzheimer's disease, *Iran Biomed. J.*, **15**, 51–58.
94. Семенович Д. С., Канунникова Н. П. (2019) Система глутатиона и S-глутатионилирование белков в структурах головного мозга крыс при алюминиевом нейротоксикозе и введении модуляторов биосинтеза CoA, *Вестник ГрДУ ім. Я. Купалы. Сер. 5. Эканоміка. Сацыялогія. Біялогія*, **9**, 144–151.
95. Semenovich, D. S., and Kanunnikova, N. P. (2020) S-glutathionylation of proteins in various types of neurodegenerative pathology and protective effects of

- pantothenic acid derivatives, *J. Integr. OMICS*, **10**, 19-25. doi: 10.5584/jiomics.v10i1.307.
96. Канунникова Н. П., Семенович Д. С., Гуринович В. А., Лукиенко Е. П., Титко О. В., Мамчиц Д. К., Песняк А. В., Мойсеенок А. Г. (2019) Нейрохимические эффекты модуляции системы CoA при алюминиевом нейротоксикозе, *Биохим. Мол. Биол. Сб. Науч. Тр.*, **3**, Минск, 95-98.
 97. Семенович Д. С., Канунникова Н. П., Мойсеенок А. Г. (2020) Окислительный стресс в митохондриях мозга при алюминиевом нейротоксикозе и введении модуляторов биосинтеза глутатиона и кофермента А, *Доклады НАН Беларуси Сер. Мед. Наук*, **64**, 78-85, doi: 10.29235/1561-8323-2020-64-1-78-85.
 98. Semenovich, D. S., Plotnikov, E. Yu., Lukiyenko, E. P., Titko, O. V., and Kanunnikova, N. P. (2021) Effects of panthenol and N-acetylcysteine on changes in the redox state of brain mitochondria under oxidative stress *in vitro*, *Antioxidants*, **10**, 1699, doi: 10.3390/antiox10111699.
 99. Мойсеенок А. Г., Омелянчик С. Н., Гуринович В. А., Шевалье А. А., Катковская И. Н., Недосекина Т. П., Гуляева Н. В. (2008) Взаимосвязь реакций S-ацилирования, нитрозилирования, дисульфидообразования и биосинтеза кофермента А в механизмах нейропротекции и нейродегенерации, *Функцион. системы организма в норме и при патол.*, сб. науч. тр. (ред. В. С. Улащик, А. Г. Чумак), Минск, РИВШ, стр. 407-412.
 100. Утно Л. Я. (ред.) (1991) *Пантетин: метаболизм, фармакология и регуляция обмена липидов*, Рига, Зинатне.
 101. Гунар В. И. (ред.) (1997) *Кофермент «А» и его предшественники: синтез, анализ и экспериментальное изучение*: сб. тр., Москва.
 102. Moiseenok, A. G. (ed.) (2013) *Biological Functions of Pantothenic Acid. Pantothenic Acid and the Brain. New Opportunities in Metabolic and Dietary Therapies. Proceedings of the International Symposium*, Grodno.
 103. Мойсеенок А. Г., Цвербаум Е. А., Рыбалко М. А. (1981) Биотрансформация пантотеновой кислоты в условиях витаминной недостаточности у человека, *Вопр. Мед. Хим.*, **27**, 780-784.
 104. Мойсеенок А. Г. (1979) Пантотеновая кислота, *Экспериментальная витаминология* (ред. Ю. М. Островский) Минск, Наука и техника, стр. 267-320.
 105. Berry, T., Abohamza, E., and Moustafa, A. A. (2020) A disease-modifying treatment for Alzheimer's disease: focus on the trans-sulfuration pathway, *Rev. Neurosci.*, **31**, 319-334, doi: 10.1515/revneuro-2019-0076.

BRAIN CoA AND ACETYL CoA SYSTEM IN MECHANISMS OF NEURODEGENERATION

Review

A. G. Moiseenok^{1*} and N. P. Kanunnikova^{1,2}

¹ *Institute of Biochemistry of Biologically Active Substances, National Academy of Sciences of Belarus, 230023 Grodno, Belarus; e-mail: andrey.moiseenok@tut.by*

² *Yanka Kupala's Grodno State University, 230023 Grodno, Belarus*

The processes of biotransformation of pantothenic acid (Pan) in the biosynthesis and hydrolysis of CoA, the key role of pantothenate kinase (PANK) and CoA synthetase (CoASY) in the formation of the priority mitochondrial pool of CoA, with a high metabolic turnover of the coenzyme and limited transport of Pan across the blood-brain barrier are considered. The system of acetyl-CoA, a secondary messenger, the main substrate of acetylation processes, including the formation of N-acetylaspartate and acetylcholine, post-translational modification of histones, determines the protection of neurons from degenerative signals and cholinergic neurotransmission. The biochemical mechanisms of neurodegenerative syndromes in PANK and CoASY defects and the possibility of correcting the development of CoA biosynthesis in knockout models for these enzymes are described. The data of a post-mortem study of the brain of patients with Huntington's and Alzheimer's diseases are presented, proving Pan deficiency in the CNS, which is especially pronounced in pathognomonic neurostructures. In the frontal cortex of patients with Parkinson's disease, combined immunofluorescence of anti-CoA- and anti-tau protein was detected, reflecting CoAlation during dimerization of the tau protein and its redox sensitivity. The redox activity and antioxidant properties of the precursors of CoA biosynthesis were confirmed *in vitro* on synaptosomal membranes and mitochondria in the modeling of aluminum neurotoxicosis, accompanied by a decrease in the level of CoA in the CNS. The ability of CoA biosynthesis precursors to stabilize the glutathione pool in neurostructures, in particular, in the hippocampus, is considered as a pathogenetic protection mechanism when exposed to neurotoxins, the development of neuroinflammation and neurodegeneration, and justifies the combined use of Pan derivatives (for example, D-panthenol) and glutathione precursors (N-acetylcysteine). Taking into account

the discovery of new functions of CoA – redox-dependent processes of CoAlation of proteins, the possible association of oxidative stress and deficiency of Pan (CoA) in neurodegenerative pathology, the study of the bioavailability and biotransformation of Pan derivatives, in particular, D-panthenol, 4'-phospho-pantethine, its acylated derivatives and compositions with redox pharmacological compounds are promising as potential etiopathogenetic agents.

Keywords: CoA biosynthesis, pantothenate kinase, CoA-synthetase, acetyl-CoA, acyl-CoA, neurodegeneration, Alzheimer's disease, pantothenic acid deficiency in the CNS, glutathione, oxidative stress

НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ В ПАТОГЕНЕЗЕ АУДИОГЕННОЙ ЭПИЛЕПСИИ: ИЗМЕНЁННЫЕ УРОВНИ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ К НЕЙ КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО–МОЛОДКИНОЙ

© 2023 Н.М. Сурина^{1*}, И.Б. Федотова¹, Г.М. Николаев¹, В.В. Греченко²,
Л.В. Ганковская², А.Д. Огурцова², И.И. Полетаева¹

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119234 Москва, Россия; электронная почта: opera_ghost@inbox.ru, ingapoletaeva@mail.ru

² Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,
117997 Москва, Россия

Поступила в редакцию 17.11.2022

После доработки 07.02.2023

Принята к публикации 08.02.2023

Нейровоспаление играет важную роль в эпилептогенезе, однако большинство исследований этого процесса выполняется на фармакологических моделях эпилепсии, в то время как данные по неинвазивным, в том числе генетическим, моделям практически отсутствуют. У крыс линии Крушинского–Молодкиной (КМ) с высокой генетической предрасположенностью к аудиогенной эпилепсии, АЭ (интенсивный судорожный припадок в ответ на действие звука), и у контрольной линии «0» (не предрасположенной к АЭ) в ткани дорзального стриатума и в стволе мозга определяли уровни ряда провоспалительных цитокинов с помощью мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа (MILLIPLEX мар Kit). Фоновые уровни интерлейкинов IL-1 β , IL-6 и фактора некроза опухолей (TNF- α) в дорзальном стриатуме крыс КМ были достоверно ниже, чем у крыс «0» (на 32,31, 27,84 и 38,87%, $p < 0,05$, 0,05 и 0,01 соответственно), тогда как в стволе мозга в «фоне» межлинейных различий в уровнях этих метаболитов не выявлено. Через 4 ч после экспозиции животных действию звука уровень TNF- α в дорзальном стриатуме крыс КМ был достоверно (на 38,34%, $p < 0,01$) ниже, чем у крыс «0». У крыс КМ после действия звука и судорожного припадка АЭ уровень IL-1 β и IL-6 в дорзальном стриатуме был достоверно выше по сравнению с «фоном» (на 35,29 и 50,21%, $p < 0,05$ и 0,01 соответственно). Содержание IL-2 у крыс КМ в «фоне» не определялось, тогда как после аудиогенных судорог его уровень составил 14,01 пг/мл (достоверно выше, $p < 0,01$). В стволе мозга крыс КМ уровни IL-1 β и TNF- α после аудиогенных судорог были достоверно ниже, чем в «фоне» (на 13,23 и 23,44% соответственно, $p < 0,05$). У крыс линии «0» уровни цитокинов в дорзальном стриатуме после действия звука (не вызвавшего судорог АЭ) не отличались от таковых в «фоне», в то время как показатели уровня IL-1 β в стволе мозга у них были ниже, чем в «фоне» (40,28%, $p < 0,01$). Таким образом, различия между фоновыми уровнями цитокинов и таковыми после действия звука были разными у крыс, различавшихся по предрасположенности к АЭ, что позволяет предположить участие цитокинов, в частности, провоспалительных факторов, в патофизиологии эпилепсии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аудиогенная эпилепсия, линия Крушинского–Молодкиной, линия «0», судороги, цитокины, воспаление, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , мультиплексный анализ.

DOI: 10.31857/S0320972523040048, EDN: AKEJVA

ВВЕДЕНИЕ

Эпилепсия является гетерогенным заболеванием, и это определяет актуальность исследования различных судорожных со-

стояний с использованием лабораторных моделей, включая генетические. Исследование таких моделей важно в плане отыскания новых мишеней для противоэпилептической терапии.

Принятые сокращения: АЭ – аудиогенная эпилепсия; КМ – крысы линии Крушинского–Молодкиной; IL – интерлейкин; TNF- α – фактор некроза опухолей.

* Адресат для корреспонденции.

Ещё в 1990–2000-х гг. [1–5] было показано, что у больных эпилепсией, а также в экспериментах с лабораторными моделями обнаруживается много аномалий в функционировании клеток иммунной системы, а также в экспрессии ряда цитокинов. Это означает, что в эпилептогенезе определённую роль играют иммунные процессы и связанные с ними воспалительные реакции [6–8]. Цитокины представляют собой гетерогенную группу полипептидных медиаторов, вырабатываемых клетками иммунной системы, которые контролируют активность иммунной системы и развитие воспалительных реакций, а также обладают «общесистемными» эффектами, в частности, способны влиять на периферическую и центральную нервную систему [3, 9, 10]. Известно, что повышения уровней таких цитокинов, как фактор некроза опухолей (TNF- α), интерлейкин-1 β (IL-1 β) и интерлейкин-6 (IL-6), связанные с экспрессией судорожных состояний, ассоциированы с последующей гибелью клеток мозга [11].

В процессе эпилептогенеза происходит повышение экспрессии провоспалительных и нейротрофических факторов [3, 12]; в частности, был показан противоэпилептический эффект IL-1 β [13]. В эксперименте развитие судорог сопровождается быстрым ростом экспрессии мРНК и белка IL-1 β в новой коре, гипоталамусе и других отделах мозга [14, 15]. На модели эпилепсии с судорогами, вызванными каиновой кислотой, был описан усиливающий судороги эффект IL-1 β [16]. Введение IL-1 β в гиппокамп крыс продлевало судороги с увеличением их интенсивности [17]. Можно также отметить, что уровень «вызывающего сон» цитокина IL-1 α у предрасположенных к АЭ мышей линии Frings (а также у линии DBA) через 6–8 ч после судорог не был изменён в гиппокампе, но был повышен в гипоталамусе, хотя данных по нему в структурах ствола мозга не представлено [18]. Было также обнаружено, что дексаметазон – синтетический глюкокортикоид, обладающий иммуносупрессивным действием – также влияет на развитие судорог (см. Обсуждение результатов).

Исследование нейровоспаления является перспективным направлением в изучении патогенеза эпилепсии, поскольку присутствие клеток врождённого иммунитета в составе микроглии головного мозга [19–21] позволяет предположить, что их активность может напрямую влиять на процесс эпилептогенеза. Данные клетки могут также стать возможной мишенью фармакологического воздействия при лечении эпилепсии. Это означает, что

исследования нейровоспаления с использованием экспериментальных моделей эпилепсии крайне актуальны. Для изучения роли цитокинов в патогенезе эпилепсии, на наш взгляд, следует отдавать предпочтение нефармакологическим моделям на животных, поскольку высокая чувствительность клеток иммунной системы к различным воздействиям может приводить к получению искажённых данных. Данных по уровню цитокинов в структурах головного мозга на нефармакологических моделях эпилепсии не так много. На линии крыс WAR (Wistar audiogenic rat) было показано, что через 4 ч после звуковой стимуляции (вызывающей клонико-тонический судорожный припадок АЭ) уровни IL-1 β , IL-6, TNF- α и мозгового фактора роста (BDNF) в неокортексе были выше, чем в состоянии покоя, т.е. в «фоне». Повышение уровней TNF- α и IL-6 было обнаружено и в стриатуме. Уровень TNF- α после звуковой стимуляции (и судорог АЭ) был также выше, чем в фоне, и в нижнем двухолмии [12]. К сожалению, данные по контрольной (по отношению к WAR) линии крыс Вистар (без АЭ) в работе не представлены.

Рефлекторная АЭ описана у крыс, мышей и хомяков [22]. Первой линией крыс, селективной на предрасположенность к АЭ, была линия Крушинского–Молодкиной (KM), создание которой было начато в конце 1940-х гг. [22]. Позднее путём селекции на основе аутбредной популяции Спрег–Доули были выведены линии GEPR-3 и GEPR-9 [23–25]. Линия WAR, наиболее интенсивно исследуемая в настоящее время, была селективирована в 1990-х гг. на основе линии Вистар (как и крысы KM) [26–27]. Путём селекции была также создана линия хомяков GASH/Sal (genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca) [28]. Известно удивительное сходство судорожного припадка АЭ у линий мышей, крыс и хомяков, выведенных в разных лабораториях в России, США, Бразилии и Испании [29] (подробнее см. Материалы и методы). Для судорог АЭ характерны, в частности, стереотипная смена стадий припадка, изменения уровней мозговых нейротрансмиттеров и особенностей состояния животного после окончания припадка [22, 27, 28]. Судороги АЭ инициируются в структурах ствола мозга (здесь детально не описанных), хотя в настоящее время предполагается и участие в этом процессе дорсального стриатума, поскольку экспозиция действию звука вызывает изменения в биохимических индексах и этой области [22, 30–33].

Аудиогенный судорожный припадок (подробнее см. Материалы и методы) начинается

со стадии «дикого бега» (wild run), в которой может быть одна или две «волны» (разделённые тормозной паузой [22]), после чего следуют фазы клонических и тонических судорог. Как упомянуто выше, данный паттерн сходен у крыс, мышей и хомяков.

Генетическая основа судорог АЭ (у исследованных видов грызунов) была описана у линии КМ [22, 34], GEPR, WAR [35, 36] и GASH/Sal [28]. Молекулярно-генетическое сравнительное исследование животных, предрасположенных и не предрасположенных к АЭ, было проведено только для соответствующих пар генотипов (животные с АЭ и контроль). Единственное сопоставление состояния мозга двух линий, WAR и GEPR (обе с АЭ), было основано на воксельной (voxel-based) морфометрии [37], однако существенной информации при этом получено не было. Не было проведено и сравнительного сопоставления транскриптомов крыс КМ и WAR. Межвидовое сравнение генов, потенциально связанных с АЭ, у WAR и GASH/Sal [38] выявило в обеих моделях повышение иммунореактивности для NPY (нейропептид Y), RGS2 (регулятор G-белкового сигнального пути 2) и TTR (транстиретин), что, возможно, отражает сам факт развития судорог. Генетические и молекулярно-генетические исследования обнаружили участие нескольких генов, возможно, важных для контроля уровня возбудимости мозга (см. работы Damasceno et al., Chuvakova et al. [39, 40]). Следует отметить, что генетические исследования мышей с АЭ включают и селекцию [41], и межлинейные сравнения, а также картирование генов [42]. Сравнительное исследование мышей линий DBA/2 и C57BL/6 также внесло вклад в эти данные. Наиболее интересным является участие гена *Vgr1* в формировании фенотипа АЭ крыс WAR, поскольку мутация этого гена была описана у мышей с АЭ [43, 44]. Следует отметить, что оценка уровней «вызывающего сон» цитокина IL1- α (определявшихся с 6–8 ч интервалами после судорог) у мышей Frings (и DBA) не выявила изменений в гиппокампе, но показала его повышенный уровень в гипоталамусе (данных по стволу мозга не было представлено) [41].

Ранее была проведена селекция по выведению новой линии крыс с контрастным (по сравнению с КМ) фенотипом, но имеющей частично сходный с КМ генетический фон (линия «0») [45]. Более чем 20 поколений селекции этой линии выявили высокую изменчивость её фенотипа АЭ – крысы с «нулевой» предрасположенностью к АЭ составляют около 25–40% популяции этой линии в каждом

поколении [45]. Отметим, что признаком для отбора (т.е. использования особи в дальнейшей селекции) и проведения экспериментальных исследований было полное отсутствие судорог АЭ в трёх последовательных звуковых экспозициях, отделённых друг от друга временным интервалом в 4–5 дней. Эта не предрасположенная к АЭ линия «0», выведенная на основе гибридов F2 от скрещивания КМ \times Вистар с двумя последовательными обратными скрещиваниями с КМ, более сходна по своему генетическому фону с линией КМ, чем исходная аутбредная линия Вистар конца 1940-х гг., генотип которой к настоящему времени мог значительно измениться [22].

Гипотеза, которая легла в основу настоящего исследования, заключалась в том, что предрасположенные к АЭ животные, как модель судорожных состояний, помогут обнаружить сходство молекулярных и биохимических механизмов АЭ с таковыми при общем эпилептогенезе (легко воспроизводимые генерализованные судороги). Таким образом, для получения последующих экспериментальных данных по использованию данной модели первым этапом анализа роли нейровоспаления в АЭ должна была стать оценка профилей цитокинов в структурах мозга у генетически предрасположенных и не предрасположенных к АЭ линий крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. Использовались 4-месячные самцы крыс линии КМ ($n = 20$) и линии «0» ($n = 18$). Все крысы линии КМ были однократно протестированы на предрасположенность к АЭ в 3-месячном возрасте, крыс линии «0» в этом же возрасте тестировали троекратно (см. Обсуждение результатов). Интенсивность припадков у крыс линии КМ была максимальной (балл «4» по условной шкале, см. ниже). Начало припадков АЭ (развитие фазы «дикого бега») происходило с латентностью 2–4 с, тоническая стадия припадков (стадия «4») наступала в пределах 10 с интервала после включения звука. У крыс линии «0» судороги в ответ на звук не развивались. Крысы обеих линий были разделены на две группы. Мозг животных первой группы (оценка фонового уровня цитокинов) был получен после эвтаназии (гильотина) без звукового воздействия (которого не было и в пределах 4 недель до опыта), в то время как эвтаназия крыс второй группы была проведена через 4 ч после звуковой экспозиции. Выбранный интервал

времени для эвтаназии после действия звука был достаточным, чтобы экспрессия измеряемых цитокинов достигла стабильного уровня [12]. Лабораторные животные содержались в питомнике Лаборатории физиологии и генетики поведения (кафедра высшей нервной деятельности биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова). Крысы содержались в пластиковых клетках (46 × 30 × 16 см) по 6–7 животных в каждой со свободным доступом к корму («Лабораторкорм», Россия) и воде с естественным режимом освещения.

Все эксперименты проводились в соответствии с биоэтическими требованиями, заключение Комиссии по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова было зарегистрировано 12.03.2014.

Процедура тестирования АЭ. Тестирование АЭ производили в звукоприглушающей прозрачной пластиковой камере с габаритами 40 × 30 × 50 см, звук громкостью 120 дБ (аудиотонный звонок) подавался с потолка камеры.

Интенсивность аудиогенных судорог оценивали по условной шкале: «0» — отсутствие реакции на звук (за исключением короткой стартл-реакции), «4» — тонические судороги всех мышц туловища, а также передних и задних конечностей, сопровождаемые временной остановкой дыхания. Судорожный припадок АЭ максимальной интенсивности наблюдали у всех крыс линии КМ, использованных в эксперименте, тогда как припадок АЭ у всех крыс линии «0» отсутствовал.

Мультиплексный анализ. Животные были умерщвлены через 4 ч после звуковой стимуляции, причём данный временной интервал был выбран также и с целью сравнения наших результатов с другими аналогичными исследованиями [12, 13].

После извлечения мозга выделяли дорсальный стриатум и ствол. Стриатумы извлекались после отсекания фронтальной коры, затем в области сенсомоторной коры справа и слева делали крестообразный надрез для доступа к стриатуму. После извлечения структуры вентромедиальная часть стриатума (*nucleus accumbens*) отсекалась. Для доступа к стволу сначала отсекали мозжечок. Структуру ствола брали вместе с нижней частью среднего мозга, включающего нижние и верхние двухолмия и верхнюю часть продолговатого мозга. Структуры извлекались на лёду и сразу же замораживались в жидком азоте. Далее образцы помещались на дальнейшее хранение при температуре -80°C до проведения анализа. Для этого ткани мозга гомогенизировали (с помощью стеклянных гомогенизаторов) в экстрак-

ционном растворе (100 мг ткани на 500 мкл раствора), содержащем: смесь ингибиторов протеазы («Roche Diagnostics GmbH», Германия), растворённых в PBS (0,01 М), содержащем 0,05%-ный Tween 20 (v/v). Гомогенат тканей центрифугировали при 3000 g в течение 10 мин при 4°C , а супернатанты собирали и хранили при -80°C . Концентрацию IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6 и TNF- α определяли с помощью мультиплексной иммунофлуоресцентной панели с магнитными шариками (MILLIPLEX map Kit, «EMD Millipore Corporation», США) в соответствии со стандартным протоколом производителя. Определение результатов анализа проводили с помощью системы Bio-Plex MAGPIX («Bio-Rad», США).

Статистический анализ. Статистический анализ был проведён на основе программного обеспечения Prism 7 («GraphPad Software», США). Проверка полученных данных на нормальность распределения проводилась с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Учитывая, что не все результаты подчинялись нормальному распределению, предпочтение было отдано непараметрическим критериям сравнения исследуемых групп — полученные значения сравнивали с использованием критерия Крускала–Уоллиса (как непараметрического варианта ANOVA) с критерием Данна в качестве *post hoc* критерия. Уровень статистической значимости был установлен при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Различия в концентрации исследуемых цитокинов в мозге были обнаружены как между образцами ткани мозга крыс КМ и «0» в «фоне», без действия звука, так и после звукового воздействия (которое сопровождалось приступами АЭ у крыс КМ, но не вызывало судорог у крыс линии «0»). Эти данные подробно описаны ниже. IL-1 α не был обнаружен ни в одном исследованном образце. Данные по уровню IL-2 и IL-6 в ткани ствола мозга не представлены, поскольку не было обнаружено ни межлинейных различий, ни различий между «фоном» и показателями после звуковой экспозиции. Концентрации данных метаболитов были ниже пороговых значений измерения во всех случаях.

Межлинейные различия в уровнях цитокинов в условиях «фона». Уровни IL-1 β , IL-6 и TNF- α в дорсальном стриатуме были достоверно ниже у крыс КМ по сравнению с крысами «0» (на 32,31, 27,84 и 38,87% соответственно,

рис. 1, а, рис. 2, б и рис. 3, а), в то время как в стволе мозга достоверных межлинейных различий в этих показателях не обнаружилось (рис. 2). Показатели концентрации IL-2 в стриатуме (рис. 2, а) у крыс «0» обнаружили высокую изменчивость как для состояния в «фоне», так и для ткани мозга, полученной после звуковой экспозиции. Такая вариабельность может быть одной из причин отсутствия достоверных межлинейных различий между показателями в «фоне» и после действия звука (данные по концентрациям IL-2 в стволе мозга не представлены). У крыс «0» по сравнению с крысами КМ обнаружилась более высокая концентрация IL-6 и TNF- α в стриатуме в «фоне» (показатели IL-6 в стволе мозга не представлены). В то же время фоновый уровень TNF- α в стволе мозга КМ vs «0» достоверно не различался (рис. 3, б).

Уровни цитокинов в мозге крыс КМ и «0» после звукового воздействия. В группе крыс КМ после звуковой экспозиции (и судорог) концентрации IL-1 β и IL-6 в дорсальном стриатуме были выше, чем соответствующие показатели в «фоне» (на 35,29 и 50,21% выше для IL-1 β и для IL-6 соответственно, рис.1, а и рис. 2, б). Различия в показателях крыс КМ («фон»-припадок) в стволе мозга для IL-1 β были обратными по знаку – его уровень после

судорог АЭ был ниже (на 13,23%, $p < 0,05$, рис. 1, б), чем в «фоне». Уровень IL-2 у крыс КМ в «фоне» не детектировался, тогда как после АЭ-судорог IL-2 был обнаружен (уровень составил 14,01 пг/мл, $p < 0,01$). Показатели IL-2 в стриатуме крыс «0» также имели тенденцию к повышению после звукового воздействия по сравнению с «фоном» (рис. 2, а). Единственным достоверным различием между «фоном» и состоянием после действия звука у крыс «0» был более низкий уровень IL-1 β в стволе мозга (на 40,28% ниже, чем в «фоне», рис. 1, б), что совпадало с направлением различий по этому показателю у крыс КМ. Концентрация TNF- α в образцах ствола мозга (но не дорсального стриатума) крыс КМ после судорог АЭ была значительно ниже, чем в «фоне» (на 23,44% ниже, $p < 0,05$, рис. 3, б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В дорсальном стриатуме крыс линии КМ уровень исследуемых цитокинов был ниже, чем у крыс линии «0» (у которых генетический фон частично сходен с таковым линии КМ, но АЭ отсутствует). Можно предположить, что в мозге крыс эти цитокины модулируют проявление судорог, но не связаны с их развитием *per se*.

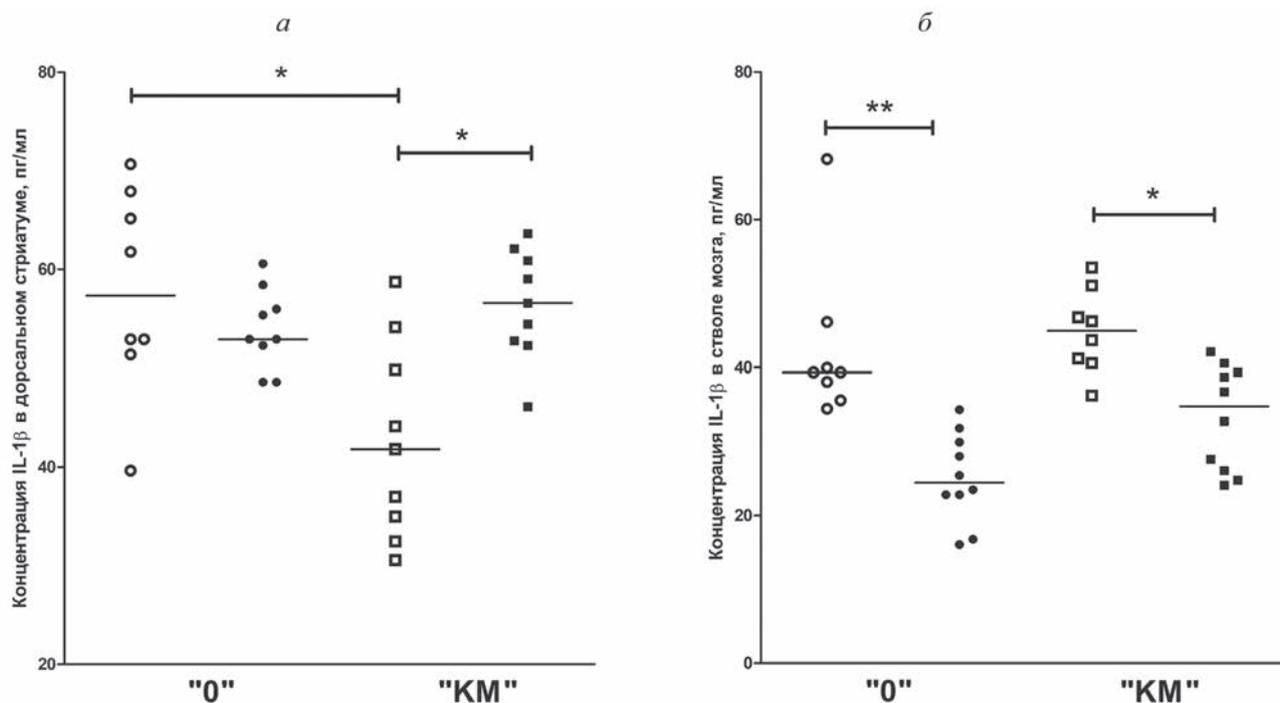


Рис. 1. Концентрации IL-1 β в дорсальном стриатуме (а) и стволе мозга (б) (пг/мл, ордината, медиана \pm межквартильный диапазон) в фоновом состоянии (белые треугольники и квадраты, «0» и «КМ» соответственно) и через 4 ч после звукового воздействия (чёрные треугольники и квадраты, «0» и «КМ» соответственно) у крыс КМ и «0». *, ** – достоверное различие при $p < 0,05$ и $0,01$ (апостериорный критерий Данна)

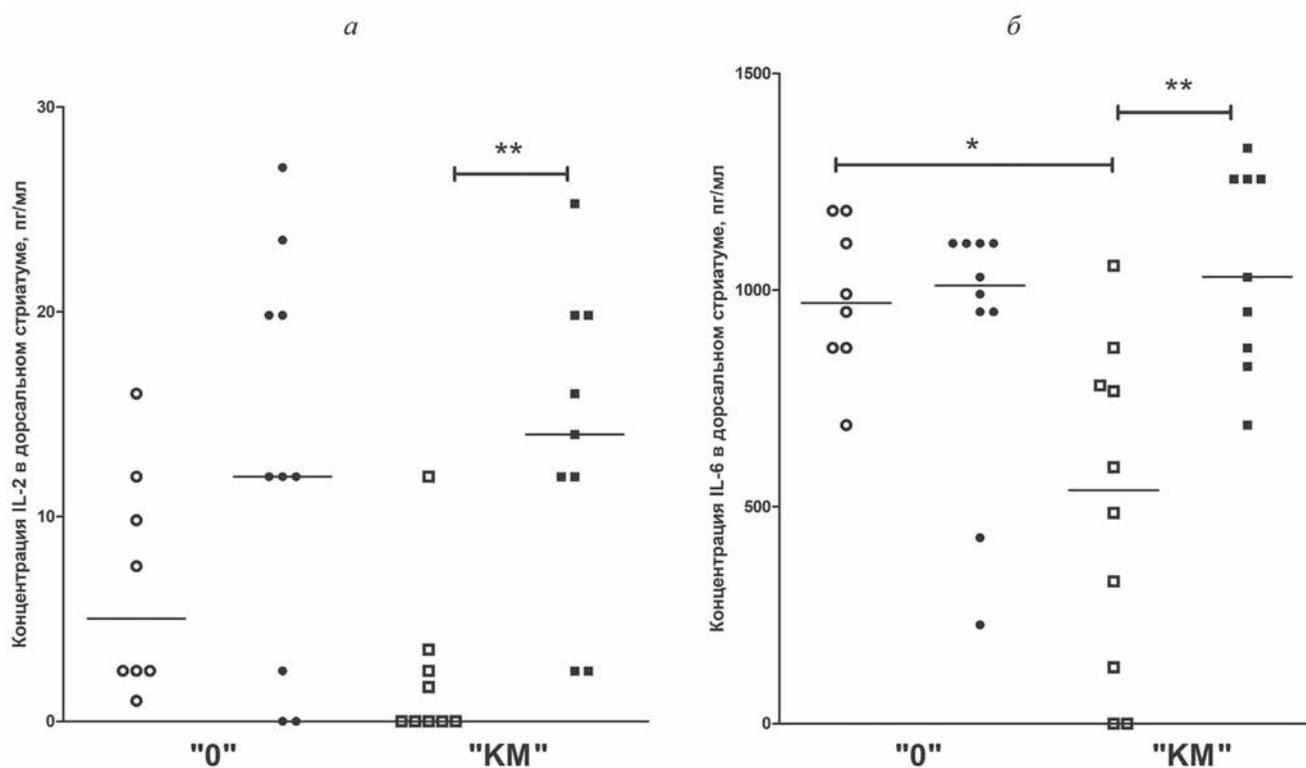


Рис. 2. Концентрации IL-2 (а) и IL-6 (б) в дорсальном стриатуме. Обозначения как на рис. 1

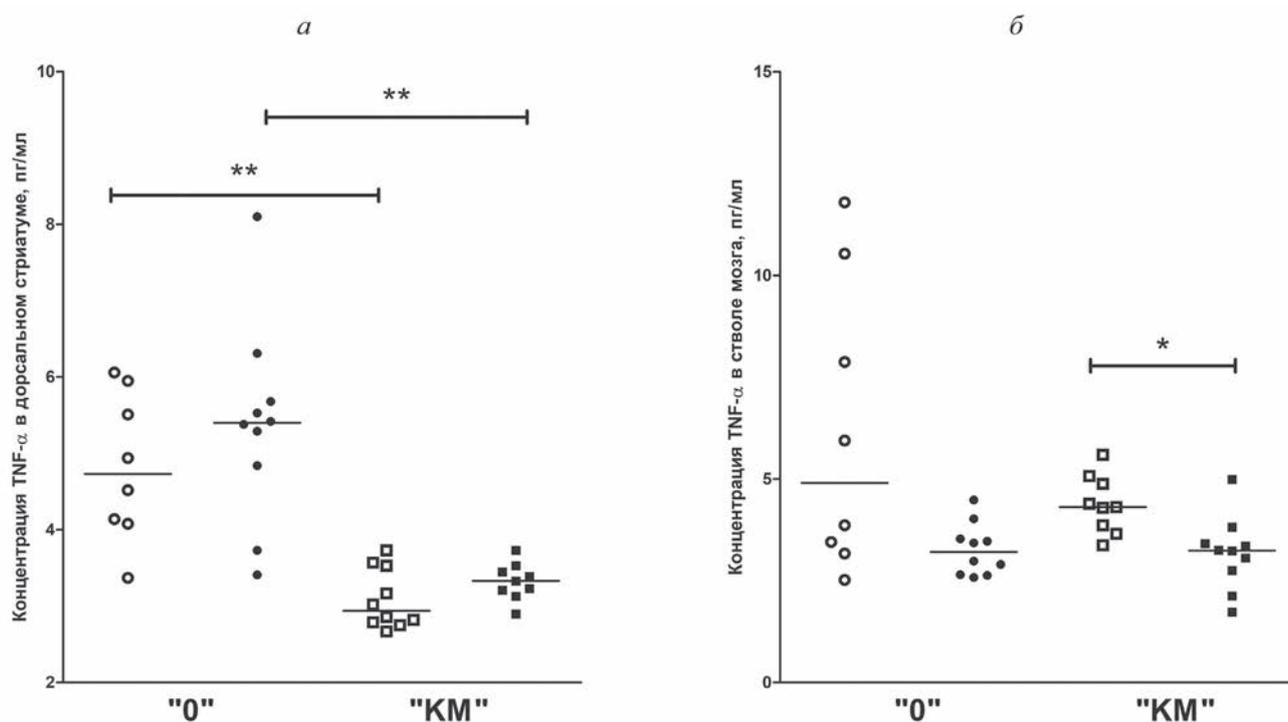


Рис. 3. Концентрации TNF-α в дорсальном стриатуме (а) и стволе мозга (б). Обозначения как на рис. 1

Генотип-специфические сниженные уровни провоспалительных цитокинов у крыс КМ в сравнении с не предрасположенными к судорогам крысами следует исследовать более подробно.

Индексы уровней этих соединений в стволе мозга соответствуют участию данных структур в реакции на звук, вызывающий припадки АЭ. Участие дорсального стриатума в АЭ изучено

недостаточно, хотя о вовлечении этого отдела мозга в генерацию аудиогенных судорог свидетельствуют биохимические данные [31–33]. В настоящей работе представлено ещё одно свидетельство участия структур стриатума в реализации судорог АЭ. Представленные данные свидетельствуют, что развитие припадка АЭ у крыс КМ сопровождалось (через 4 ч после судорог, как в работах De Souza Bernardino et al. и Saayah et al. [12, 13]) достоверно более высокими уровнями IL-1 β и IL-6 в этой структуре мозга. Уровни цитокинов в стриатуме у крыс линии «0» (отсутствие АЭ после действия звука) не обнаружили отличий от таковых «фона». Логично предположить, что изменения этих показателей в стриатуме крыс КМ могут быть вызваны активными движениями животных (во время фазы быстрого бега и клонико-тонических судорог), поскольку ни таких движений, ни изменений этих показателей у крыс «0» не было. В то же время уровень IL-1 β в стволе мозга у крыс линии «0» после экспозиции действию звука был ниже такового в «фоне», как и у крыс КМ (что могло быть связано с «латентной» реакцией крыс «0» на действие звука). Это, по-видимому, может указывать на то, что у этих крыс предрасположенность к АЭ существует в скрытой форме, поскольку введение подпороговых доз коразола позволило вызвать у них припадки АЭ [46]. Изменение уровня продукции TNF- α в тканях головного мозга при развитии судорог АЭ (впервые показанное в данной работе) заслуживает дальнейшего внимания и более детального анализа.

В литературных источниках, касающихся возможной связи между уровнями провоспалительных цитокинов и судорожными состояниями, содержатся данные и о клинических случаях, и об исследованиях эпилептогенеза в моделях на животных. В целом данные, полученные в настоящем исследовании (т.е. о реакциях мозговых цитокинов на развитие судорог) сходны с многочисленными клиническими и экспериментальными результатами, некоторые из них будут упомянуты ниже.

Исследования отклонений от нормы уровней ряда цитокинов, и, в особенности, IL-1 β и его функционального рецептора IL-1RI в спинномозговой жидкости и даже в ткани мозга (в случаях хирургических операций) у больных разными формами эпилепсии [47–52], показали, что у больных вскоре после тонико-клонических судорог активируется продукция цитокинов (включающих NGF, IL-1 β и TNF- α). Это предполагает связь данной активации с недавним гипервозбуждением во время судорожного припадка. Рассматривается

также вопрос о возможной дисфункции гематоэнцефалического барьера вследствие судорог [53]. На негенетических моделях эпилепсии также было показано вовлечение системы цитокинов в процесс развития судорог [8–15, 54–57].

Цитокины рассматриваются так же, как соединения-медиаторы при развитии спонтанных судорог у мышей [58]. В исследованиях эпилепсии наиболее часто анализируют экспрессию IL-1, IL-6 и TNF- α . Уровни этих цитокинов варьируют в зависимости от типа судорог, продуцируемых в лабораторных моделях [53–55]. IL-2 играет важную роль в регуляции иммунного ответа путём активации Т-клеток [56, 57]. Внутривенное введение IL-2 мышам DBA/2 активировало аудиогенные и фармакологически вызванные судороги [55]. При этом у собак с эпилепсией уровни цитокинов также отклонялись от нормы [59].

Многофункциональная цитокиновая система IL-6 вовлечена в воспалительные реакции организма, включая центральную нервную систему [60–63], и было непосредственно показано участие IL-6 в процессе дегенерации нейронов [60]. В настоящей работе не рассматривается вопрос о корреляциях уровней цитокинов с феноменами «киндлинга» и status epilepticus.

Как упоминалось выше, исследования процессов нейровоспаления на экспериментальных моделях эпилепсии немногочисленны. Было обнаружено, что у мышей-нокаут по IL-6 (IL-6 $-/-$) порог судорог, вызванных электрошоком, не отличался от такового у животных дикого типа, однако у мышей-нокаут обнаружился аудиогенный припадок [58].

По всей видимости, связь воспаления и эпилептогенеза достаточно сложна. Провокация воспаления может запустить судороги специфического типа (например, при лихорадочном состоянии), тогда как судороги *per se* могут вызвать в мозге воспалительный процесс. Дексаметазон, синтетический глюкокортикоид с противовоспалительными и иммуносупрессивными свойствами, выявленными и в клинике, и в эксперименте, влияет на состояние системы воспаления и на астроглиоз [64–66]. Положительный терапевтический эффект дексаметазона был обнаружен у больных с рефлекторной формой эпилепсии – добавление его к стандартной противосудорожной терапии вызвало прекращение судорог [67]. У крыс линии КМ хроническое введение дексаметазона резко снижало интенсивность АЭ, увеличивало латентный период судорог. В большей части случаев фаза «дикого бега»

после дексаметазона проходила у крыс КМ «в две волны» с тормозной паузой между ними. «Двухволновость» этой фазы припадка АЭ является индикатором снижения судорожной готовности [68].

В целом, значимые уровни IL-1 β , IL-6 и TNF- α обнаруживаются физиологически в мозге взрослого человека и влияют на развитие судорог при эпилепсии [6, 67].

В любом случае, для оценки роли нейровоспаления в развитии судорожных состояний как полученные в настоящей работе данные, так и межлинейные различия, обнаруживаемые в разных лабораторных моделях эпилепсии, требуют дальнейшего анализа [69, 70].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уровни цитокинов в стволе мозга и дорсальном стриатуме обнаружили ряд межлинейных различий (линия КМ vs линия «0», из которых первая – линия с высокой предрасположенностью к АЭ, а животные второй таких припадков не обнаруживают). Различия выявлены в мозге крыс и в состоянии покоя («фона»), и через 4 ч после экспозиции животных действию звука (соответственно у крыс КМ после судорог АЭ, а у крыс линии «0» без судорог). Экспозиция действию звука сопровождалась изменениями уровня IL-1 β в стволе мозга у крыс обеих линий и выражалась в более низких уровнях этого метаболита после действия звука, изменения уровня TNF- α в стволе мозга были достоверными только для крыс КМ. Изменения уровней цитокинов в стриатуме после судорог АЭ указывают, возможно, на пока предполагаемую регуляторную

роль этой структуры в реализации припадков рефлекторной эпилепсии. Это означает, что животных с предрасположенностью к АЭ (вместе с соответствующими контрольными группами) можно успешно использовать для экспериментального исследования про- и противовоспалительных процессов в мозге как возможных факторов эпилептогенеза.

Вклад авторов. Концептуализация – Н.М.С., И.И.П., И.Б.Ф., В.В.Г.; программное обеспечение – В.В.Г., И.И.П., Л.В.Г., Г.М.Н.; проверка данных – И.И.П., И.Б.Ф., В.В.Г.; обеспечение эксперимента – Н.М.С., И.Б.Ф., В.В.Г.; курирование данных – Н.М.С., В.В.Г., А.Д.О.; подготовка оригинального проекта – Н.М.С., И.И.П.; рецензирование и редактирование – Н.М.С., И.И.П.; руководство – И.Б.Ф.; привлечение финансирования – И.И.П., Н.М.С., И.Б.Ф. Все авторы прочитали опубликованную версию рукописи и согласились с ней.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500080-8 и междисциплинарной научной и образовательной школы Московского государственного университета «Мозг, когнитивные системы, искусственный интеллект».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Эксперименты проводились в соответствии с биоэтическими требованиями Комиссии по биоэтике Московского государственного университета (регистрация 12.03.2014) и Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза «О защите животных, используемых для научных целей».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Li, G., Bauer, S., Nowak, M., Norwood, B., Tackenberg, B., Rosenow, F., Knake, S., Oertel, W. H., and Hamer, H. M. (2011) Cytokines and epilepsy, *Seizure*, **20**, 249-256, doi: 10.1016/j.seizure.2010.12.005.
2. Lehtimäki, K. A., Keränen, T., Palmio, J., Mäkinen, R., Hurme, M., Honkaniemi, J., et al. (2007) Increased plasma levels of cytokines after seizures in localization-related epilepsy, *Acta Neurol. Scand.*, **116**, 226-230, doi: 10.1111/j.1600-0404.2007.00882.x.
3. Vezzani, A., Balosso, S., and Ravizza, T. (2019) Neuro-inflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy, *Nat. Rev. Neurol.*, **15**, 459-472, doi: 10.1038/s41582-019-0217-x.
4. Zhang, Z., Liu, Q., Liu, M., Wang, H., Dong, Y., Ji, T., Liu, X., Jiang, Y., Cai, L., and Wu, Y. (2018) Upregulation of HMGB1-TLR4 inflammatory pathway in focal cortical dysplasia type II, *J. Neuro-inflamm.*, **15**, 27, doi: 10.1186/s12974-018-1078-8.
5. Zhang, X., Wang, M., Feng, B., Zhang, Q., Tong, J., Wang, M., Lu, C., and Peng, S. (2022) Seizures in PPT1 knock-in mice are associated with inflammatory activation of microglia, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 5586, doi: 10.3390/ijms23105586.
6. Wolinski, P., Ksiazek-Winiarek, D., and Glabinski, A. (2022) Cytokines and neurodegeneration in epileptogenesis, *Brain Sci.*, **12**, 380, doi: 10.3390/brainsci12030380.

7. Plata-Salaman, C. R., Ilyin, S. E., Turrin, N. P., Gayle, D., Flynn, M. C., Romanovitch, A. E., et al. (2000) Kindling modulates the IL-1beta system, TNF-alpha, TGF-beta1 and neuropeptide mRNAs in specific brain regions, *Mol. Brain Res.*, **75**, 248-258, doi: 10.1016/s0169-328x(99)00306-x.
8. Kalueff, A. V., Lehtimäki, K. A., Ylinen, A., Honkaniemi, J., and Peltola, J. (2004) Intranasal administration of human IL-6 increases the severity of chemically induced seizures in rats, *Neurosci. Lett.*, **365**, 106-110, doi: 10.1016/j.neulet.2004.04.061.
9. Hopkins, S. J., and Rothwell, N. J. (1995) Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition, *Trends Neurosci.*, **18**, 83-88, doi: 10.1016/0166-2236(95)93890-a.
10. Walker, A., Russmann, V., Deeg, C. A., von Toerne, C., Kleinwort, K. J. H., Szober, C., Rettenbeck, M. L., von Rüden, E. L., Goc, J., Ongerth, T., Boes, K., Salvamoser, J. D., Vezzani, A., Hauck, S. M., and Potschka, H. (2016) Proteomic profiling of epileptogenesis in a rat model: focus on inflammation, *Brain Behav. Immun.*, **53**, 138-158, doi: 10.1016/j.bbi.2015.12.007.
11. Vezzani, A., Balosso, S., Aronica, E., and Ravizza, T. (2009) Basic mechanisms of status epilepticus due to infection and inflammation, *Epilepsia*, **50**, 56-57, doi: 10.1111/j.1528-1167.2009.02370.x.
12. De Souza Bernardino, T. C., Teixeira, A. L., Miranda, A. S., Guidine, P. M., Rezende, G., Doretto, M. C., Castro, G. P., Drummond, L., Dutra Moraes, M. F., Lopes Tito, P. A., Pinheiro de Oliveira, A. C., and Reis, H. J. (2015) Wistar Audiogenic Rats (WAR) exhibit altered levels of cytokines and brain derived neurotrophic factor following audiogenic seizures, *Neurosci. Lett.*, **597**, 154-158, doi: 10.1016/j.neulet.2015.04.046.
13. Sayyah, M., Beheshti, S., Shokrgozar, M. A., Eslami-far, A., Deljoo, Z., Khabiri, A. R., et al. (2005) Antiepileptogenic and anticonvulsant activity of interleukin-1 beta in amygdala-kindled rats, *Exp. Neurol.*, **191**, 145-153, doi: 10.1016/j.expneurol.2004.08.032.
14. Minami, M., Kuraishi, Y., Yamaguchi, T., Nakai, S., Hirai, Y., and Satoh, M. (1990) Convulsants induce interleukin-1 beta messenger RNA in rat brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **171**, 832-837, doi: 10.1016/0006-291x(90)91221-d.
15. Eriksson, C., Tehranian, R., Iverfeldt, K., Winblad, B., and Schultzberg, M. (2000) Increased expression of mRNA encoding interleukin-1beta and caspase-1, and the secreted isoform of interleukin-1 receptor antagonist in the rat brain following systemic kainic acid administration, *J. Neurosci. Res.*, **60**, 266-279, doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(20000415)60:2<266::AID-JNR16>3.0.CO;2-P.
16. Lehtimäki, K. A., Peltola, J., Koskikallio, E., Keränen, T., and Honkaniemi, J. (2003) Expression of cytokines and cytokine receptors in the rat brain after kainic acid-induced seizures, *Mol. Brain Res.*, **110**, 253-260, doi: 10.1016/s0169-328x(02)00654-x.
17. Vezzani, A., Conti, M., De Luigi, A., Ravizza, T., Moneta, D., Marchesi, F., et al. (1999) Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures, *J. Neurosci.*, **19**, 5054-5065, doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-12-05054.1999.
18. Gahring, L. C., White, H. S., Skradski, S. L., Carlson, N. G., and Rogers, S. W. (1996) Interleukin-1alpha in the brain is induced by audiogenic seizure, *Neurobiol. Dis.*, **3**, 263-269, doi: 10.1006/nbdi.1996.0123.
19. Mika, J. (2008) Modulation of microglia can attenuate neuropathic pain symptoms and enhance morphine effectiveness, *Pharmacol. Rep.*, **60**, 297-307.
20. Wyatt-Johnson, S. K., Herr, S. A., and Brewster, A. L. (2017) Status epilepticus triggers time dependent alterations in microglia abundance and morphological phenotypes in the hippocampus, *Front. Neurol.*, **8**, 700, doi: 10.3389/fneur.2017.00700.
21. Bosco, D. B., Zheng, J., Xu, Z., Peng, J., Eyo, U. B., Tang, K., Yan, C., Huang, J., Feng, L., Wu, G., Richardson, J. R., Wang, H., and Wu, L. J. (2018) RNAseq analysis of hippocampal microglia after kainic acid-induced seizures, *Mol. Brain*, **11**, 34, doi: 10.1186/s13041-018-0376-5.
22. Poletaeva, I. I., Surina, N. M., Kostina, Z. A., Perepelkina, O. V., and Fedotova, I. B. (2017) The Krushinsky-Molodkina rat strain: the study of audiogenic epilepsy for 65 years, *Epilepsy Behav.*, **71**, 130-141, doi: 10.1016/j.yebeh.2015.04.072.
23. Ross, K. C., and Coleman, J. R. (2000) Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **24**, 639-653, doi: 10.1016/s0149-7634(00)00029-4.
24. Dailey, J. W., Reigel, C. E., Mishra, P. K., and Jobe, P. C. (1989) Neurobiology of seizure predisposition in the genetically epilepsy-prone rat, *Epilepsy Res.*, **3**, 3-17, doi: 10.1016/0920-1211(89)90063-6.
25. Ribak, C. E. (2017) An abnormal GABAergic system in the inferior colliculus provides a basis for audiogenic seizures in genetically epilepsy-prone rats, *Epilepsy Behav.*, **71**, 160-164, doi: 10.1016/j.yebeh.2015.02.024.
26. Garcia-Cairasco, N., Doretto, M. C., Prado, R. P., Jorge, B. P., Terra, V. C., and Oliveira, J. A. (1992) New insights into behavioral evaluation of audiogenic seizures. A comparison of two ethological methods, *Behav Brain Res.*, **48**, 49-56, doi: 10.1016/s0166-4328(05)80138-x.
27. Garcia-Cairasco, N., Umeoka, E. H. L., and Cortes de Oliveira, J. A. (2017) The Wistar Audiogenic Rat (WAR) strain and its contributions to epileptology and related comorbidities: history and perspectives, *Epilepsy Behav.*, **71**, 250-273, doi: 10.1016/j.yebeh.2017.04.001.

28. Muñoz, L. J., Carballosa-Gautam, M. M., Yanowsky, K., García-Atarés, N., and López, D. E. (2017) The genetic audiogenic seizure hamster from Salamanca: the GASH:Sal, *Epilepsy Behav.*, **71**, 181-192, doi: 10.1016/j.yebeh.2016.03.002.
29. Maxson, S. C. (2017) A genetic context for the study of audiogenic seizures, *Epilepsy Behav.*, **71**, 154-159, doi: 10.1016/j.yebeh.2015.12.031.
30. Fedotova, I. B., Surina, N. M., Nikolaev, G. M., Revishchin, A. V., and Poletaeva, I. I. (2021) Rodent brain pathology, audiogenic epilepsy, *Biomedicines*, **9**, 1641, doi: 10.3390/biomedicines9111641.
31. Фирстова Ю. Ю., Абаимов Д. А., Сурина Н. М., Полетаева И. И., Федотова И. Б., Ковалёв Г. И. (2012) Связывание специфических лигандов D2- и NMDA-рецепторами клеток стриатума крыс двух линий, контрастных по предрасположенности к аудиогенной эпилепсии, *Бюлл. Эксп. Биол. Мед.*, **154**, 196-198, doi: 10.1007/s10517-012-1910-6.
32. Сорокин А. Я., Кудрин В. С., Клодт П. М., Туомисто Л., Полетаева И. И., Раевский К. С. (2004) Межлинейные различия в эффектах амфетамина и раклоприда на активность дофаминергической системы в дорзальном стриатуме крыс линии КМ и Вистар (микродиализное исследование), *Генетика*, **40**, 846-849.
33. Дорофеева Н. А., Глазова М. В., Худик К. А., Никитина Л. С., Кириллова Д., Черниговская Е. В. (2015) Сравнительное исследование нигростриарной системы у крыс линии Вистар и крыс, предрасположенных к судорогам, *Журн. Эвол. Биохим. Физиол.*, **51**, 204-213.
34. Федотова И. Б., Костына З. А., Полетаева И. И., Колпаков В. Г., Барыкина Н. Н., Аксенович Т. И. (2005) Генетический анализ предрасположенности крыс линии Крушинского–Молодкиной к аудиогенной эпилепсии, *Генетика*, **41**, 1487-1494.
35. Kurtz, B. S., Lehman, J., Garlick, P., Amberg, J., Mishra, P. K., Dailey, J. W., Weber, R., and Jobe, P. C. (2001) Penetrance and expressivity of genes involved in the development of epilepsy in the genetically epilepsy-prone rat (GEPR), *J. Neurogenet.*, **15**, 233-244, doi: 10.3109/01677060109167379.
36. Doretto, M. C., Fonseca, C. G., Lobo, R. B., Terra, V. C., Oliveira, J. A., and Garcia-Cairasco, N. (2003) Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR), *Behav. Genet.*, **33**, 33-42, doi: 10.1023/a:1021099432759.
37. Lee, Y., Rodriguez, O. C., Albanese, C., Santos, V. R., Cortes de Oliveira, J. A., Donatti, A. L. F., Fernandes, A., Garcia-Cairasco, N., N'Gouemo, P., and Forcelli, P. A. (2018) Divergent brain changes in two audiogenic rat strains: a voxel-based morphometry and diffusion tensor imaging comparison of the genetically epilepsy prone rat (GEPR-3) and the Wistar Audiogenic Rat (WAR), *Neurobiol. Dis.*, **111**, 80-90, doi: 10.1016/j.nbd.2017.12.014.
38. Damasceno, S., Gómez-Nieto, R., Garcia-Cairasco, N., Herrero-Turrión, M. J., Marín, F., and López, D. E. (2020) Top common differentially expressed genes in the epileptogenic nucleus of two strains of rodents susceptible to audiogenic seizures: WAR and GASH/Sal, *Front. Neurol.*, **11**, 33, doi: 10.3389/fneur.2020.00033.
39. Damasceno, S., Menezes, N. B., Rocha, C. S., Matos, A. H. B., Vieira, A. S., Moraes, M. F. D., Martins, A. S., Lopes-Cendes, I., and Godard, A. L. B. (2018) Transcriptome of the Wistar audiogenic rat (WAR) strain following audiogenic seizures, *Epilepsy Res.*, **147**, 22-31, doi: 10.1016/j.eplepsyres.2018.08.010.
40. Chuvakova, L. N., Funikov, S. Y., Rezvykh, A. P., Davletshin, A. I., Evgen'ev, M. B., Litvinova, S. A., Fedotova, I. B., Poletaeva, I. I., and Garbuz, D. G. (2021) Transcriptome of the Krushinsky–Molodkina audiogenic rat strain and Identification of possible audiogenic epilepsy-associated genes, *Front. Mol. Neurosci.*, **14**, 738930, doi: 10.3389/fnmol.2021.738930.
41. Klein, B. D., Fu, Y. H., Ptacek, L. J., and White, H. S. (2004) c-Fos immunohistochemical mapping of the audiogenic seizure network and tonotopic neuronal hyperexcitability in the inferior colliculus of the Frings mouse, *Epilepsy Res.*, **62**, 13-25, doi: 10.1016/j.eplepsyres.2004.06.007.
42. Neumann, P. E., and Collins R. L. (1991) Genetic dissection of susceptibility to audiogenic seizures in inbred mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 5408-5412, doi: 10.1073/pnas.88.12.5408.
43. Damasceno, S., Fonseca, P. A. S., Rosse, I. C., Moraes, M. F. D., de Oliveira, J. A. C., Garcia-Cairasco, N., and Brunialti Godard, A. L. (2021) Putative causal variant on Vlg1 for the epileptic phenotype in the model Wistar audiogenic rat, *Front. Neurol.*, **9**, 12, 647859, doi: 10.3389/fneur.2021.647859.
44. Shin, D., Lin, S.T., Fu, Y.H., Ptáček, L.J. (2013) Very large G protein-coupled receptor 1 regulates myelin-associated glycoprotein via Gαs/Gαq-mediated protein kinases A/C, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 19101-19106, doi: 10.1073/pnas.1318501110.
45. Федотова И.Б., Костына З.А., Сурина Н.М., Полетаева И.И. (2012) Селекция лабораторных крыс на признак «отсутствие предрасположенности к аудиогенной эпилепсии», *Генетика*, **48**, 685-691.
46. Fedotova, I. B., Surina, N. M., Nikolaev, G. M., and Poletaeva, I. I. (2016) Subthreshold corazol doses induced generalized seizures in audigenic seizure-prone rats, *Int. J. Neurol Brain Disord.*, **3**, 1-6.
47. Ravizza, T., Boer, K., Redeker, S., Spliet, W. G., van Rijen, P. C., Troost, D., Vezzani, A., and Aronica, E. (2006) The IL-1beta system in epilepsy-associated malformations of cortical development, *Neurobiol. Dis.*, **24**, 128-43, doi: 10.1016/j.nbd.2006.06.003.

48. Peltola, J., Palmio, J., Korhonen, L., Suhonen, J., Miettinen, A., Hurme, M., et al. (2000) Interleukin-6 and Interleukin-1 receptor antagonist in cerebrospinal fluid from patients with recent tonic-clonic seizures, *Epilepsy Res.*, **41**, 205-211, doi: 10.1016/s0920-1211(00)00140-6.
49. Haspolat, S., Mihci, E., Coskun, M., Gumuslu, S., Ozben, T., and Yegin, O. (2002) Interleukin1beta, tumor necrosis factor-alpha, and nitrite levels in febrile seizures, *J. Child Neurol.*, **17**, 749-751, doi: 10.1177/08830738020170101501.
50. Uludag, I. F., Bilgin, S., Zorlu, Y., Tuna, G., and Kirkali, G. (2013) Interleukin-6, interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist levels in epileptic seizures, *Seizure*, **22**, 457-461, doi: 10.1016/j.seizure.2013.03.004.
51. Ryo, Y., Yamaguchi, H., Matsushita, T., Fujii, T., Hiwatashi, A., and Kira, J.-I. (2017) Early strong intrathecal inflammation in cerebellar type multiple system atrophy by cerebrospinal fluid cytokine/chemokine profiles: a case control study, *J. Neuroinflamm.*, **14**, 89, doi: 10.1186/s12974-017-0863-0.
52. Tan, T. H., Perucca, P., O'Brien, T. J., Kwan, P., and Monif, M. (2021) Inflammation, ictogenesis, and epileptogenesis: an exploration through human disease, *Epilepsia*, **62**, 303-324, doi: 10.1111/epi.16788.
53. Matsuo, T., Komori, R., Nakatani, M., Ochi, S., Yokota-Nakatsuma, A., Matsumoto, J., Takata, F., Dohgu, S., Ishihara, Y., and Itoh, K. (2022) Levetiracetam suppresses the infiltration of neutrophils and monocytes and downregulates many Inflammatory cytokines during epileptogenesis in pilocarpine-induced status epilepticus mice, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 7671, doi: 10.3390/ijms23147671.
54. Balosso, S., Ravizza, T., Perego, C., Peschon, J., Campbell, I. L., De Simoni, M. G., et al. (2005) Tumor necrosis factor-alpha inhibits seizures in mice via p75 receptors, *Ann. Neurol.*, **57**, 804-812, doi: 10.1002/ana.20480.
55. De Sarro, G., Rotiroti, D., Audino, M.G., Gratteri, S., and Nistico, G. (1994) Effects of interleukin-2 on various models of experimental epilepsy in DBA/2 mice. *Neuroimmunomodulation*, **1**, 361-369, doi: 10.1159/000097189.
56. De Simoni, M. G., Perego, C., Ravizza, T., Moneta, D., Conti, M., Marchesi, F., et al. (2000) Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus, *Eur. J. Neurosci.*, **12**, 2623-2633, doi: 10.1046/j.1460-9568.2000.00140.x.
57. Benczik, M., and Gaffen, S. L. (2004) The interleukin IL-2 family cytokines: survival and proliferation signaling pathways in T lymphocytes, *Immunol. Invest.*, **33**, 109-142, doi: 10.1081/imm-120030732.
58. De Luca, G., Di Giorgio, R. M., Macaione, S., Calpona P. R., Costantino, S., Di Paola, E. D., De Sarro, A., Ciliberto, G., and De Sarro, G. (2004) Susceptibility to audiogenic seizure and neurotransmitter amino acid levels in different brain areas of IL-6-deficient mice, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **78**, 75-81, doi: 10.1016/j.pbb.2004.02.004.
59. Kostic, D., Carlson, R., Henke, D., Rohn, K., and Tipold, A. (2019) Evaluation of IL-1β levels in epilepsy and traumatic brain injury in dogs, *BMC Neurosci.*, **20**, 29, doi: 10.1186/s12868-019-0509-5.
60. Yamada, M., and Hatanaka, H. (1994) Interleukin-6 protects cultured rat hippocampal neurons against glutamate-induced cell death, *Brain Res.*, **643**, 173-180, doi: 10.1016/0006-8993(94)90023-x.
61. Ali, C., Nicole, O., Docagne, F., Lesne, S., MacKenzie, E. T., Nouvelot, A., et al. (2000) Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **20**, 956-966, doi: 10.1097/00004647-200006000-00008.
62. Toulmond, S., Vige, X., Fage, D., and Benavides, J. (1992) Local infusion of interleukin-6 attenuates the neurotoxic effects of NMDA on rat striatal cholinergic neurons, *Neurosci. Lett.*, **144**, 49-52, doi: 10.1016/0304-3940(92)90713-h.
63. Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M., and Taga, T. (1995) Interleukin-6 family of cytokines and gp130, *Blood*, **86**, 1243-1254, doi: 10.1182/blood.V86.4.1243.bloodjournal8641243.
64. Ramos, A. B., Cruz, R. A., Villemarette-Pittman, N. R., Olejniczak, P. W., and Mader, Jr. E. C (2019) Dexamethasone as abortive treatment for refractory seizures or status epilepticus in the inpatient setting, *J. Invest. Med. High Impact Case Rep.*, **7**, 2324709619848816, doi: 10.1177/2324709619848816.
65. Vizuete, A. F. K., Hansen, F., Negri, E., Leite, M. C., de Oliveira, D. L., and Gonçalves, C. A. (2018) Effects of dexamethasone on the Li-pilocarpine model of epilepsy: protection against hippocampal inflammation and astrogliosis, *J. Neuroinflamm.*, **15**, 68, doi: 10.1186/s12974-018-1109-5.
66. Guzzo, E. F. M., Lima, K. R., Vargas, C. R., and Coitinho, A. S. (2018) Effect of dexamethasone on seizures and inflammatory profile induced by Kindling Seizure Model, *J. Neuroimmunol.*, **325**, 92-98, doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.10.005.
67. Kamali, A. N., Zian, Z., Bautista, J. M., Hamedifar, H., Hossein-Khannazer, N., Hosseinzadeh, R., Yazdani, R., and Azizi, G. (2021) The potential role of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in epilepsy pathogenesis, *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*, **21**, 1760-1774, doi: 10.2174/1871530320999201116200940.
68. Surina, N. M., Fedotova, I. B., and Poletaeva, I. I. (2022) The effects of acute and chronic infusions of dexamethasone on audiogenic seizures and catalepsy in rats of Krushinsky–Molodkina and “0” Strains, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **58**, 1110-1118, doi: 10.1134/S0022093022040147.

69. Leo, A., Nesci, V., Tallarico, M., Amodio, N., Gallo Cantafio, E. M., De Sarro, G., Constanti, A., et al. (2020) IL-6 receptor blockade by tocilizumab Has anti-absence and anti-epileptogenic effects in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy, *Neurotherapeutics*, **17**, 2004-2014, doi: 10.1007/s13311-020-00893-8.
70. Löscher, W., Ferland, R. J., and Ferraro, T. N. (2017) The relevance of inter- and intrainstrain differences in mice and rats and their implications for models of seizures and epilepsy, *Epilepsy Behav.*, **73**, 214-235, doi: 10.1016/j.yebeh.2017.05.040.

**NEUROINFLAMMATION IN THE PATHOGENESIS
OF THE AUDIOGENIC EPILEPSY:
ALTERED PROINFLAMMATORY CYTOKINE LEVELS
IN KRUSHINSKY–MOLODKINA SEIZURE-PRONE RATS**

**N. M. Surina^{1*}, I. B. Fedotova¹, G. M. Nikolaev¹, V. V. Grechenko², L. V. Gankovskaya²,
A. D. Ogurtsova², and I. I. Poletaeva¹**

¹ *Biology Department, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; e-mail: opera_ghost@inbox.ru, ingapoletaeva@mail.ru*

² *Pirogov Russian National Research Medical University, 117997 Moscow, Russia*

Neuroinflammation plays an important role in epileptogenesis, however, most studies are performed on pharmacological models of epilepsy, while data on non-invasive, including genetic, models are practically absent. In Krushinsky–Molodkina (KM) strain rats with high genetically caused predisposition to AE (intensive audiogenic seizure fit in response to the action of sound) and in the control strain “0” (not predisposed to AE), the levels of a number of pro-inflammatory cytokines were investigated using multiplex immunofluorescence magnetic assay (MILLIPLEX map Kit). Cytokine levels were determined in the dorsal striatum tissue and in the brain stem. Background levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the dorsal striatum of KM rats were significantly lower than in rats “0” (32.31, 27.84 and 38.87% of decrease, respectively, $p < 0.05$, 0.05 and 0.01), whereas in the brain stem in the “background” state of interstrain differences in levels of these metabolites were not detected. 4 h after sound exposure, the TNF- α level in the dorsal striatum of KM rats was significantly (38.34%, $p < 0.01$) lower than in “0” rats. In KM rats, after the action of sound and the subsequent seizure fit, the levels of IL-1 β and IL-6 in the dorsal striatum were significantly higher compared to the background (35.29 and 50.21%, of increase, $p < 0.05$, 0.01, respectively). The IL-2 level in KM rats in the background state was not detected, whereas after audiogenic seizures its level was 14.01 pg/ml (significantly higher, $p < 0.01$). In the brain stem of KM rats, the levels of IL-1 β and TNF- α after audiogenic seizures were significantly lower than in the background (13.23 and 23.44% of decrease, respectively, $p < 0.05$). In rats of the “0” strain, the levels of cytokines in the dorsal striatum after the action of sound (which did not cause AE seizures) did not differ from those in the background, while the levels of IL-1 β in their brain stem were lower than in the background (40.28%, $p < 0.01$). Thus, the differences between the background levels of cytokines and those after the action of sound were different in rats that differed in their predisposition to AE, which suggests the involvement of these metabolites in the pathophysiology of epilepsy.

Keywords: audiogenic epilepsy, Krushinsky–Molodkina strain, “0” strain rats, seizures, cytokines, inflammation, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , multiplex assay

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ПСИХИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ: ЭНДОГЕННАЯ ИНТОКСИКАЦИЯ

Обзор

© 2023 М.Г. Узбекиков

Московский научно-исследовательский институт психиатрии – филиал Национального медицинского исследовательского центра психиатрии и наркологии им. В.П. Сербского Минздрава России, 107258 Москва, Россия; электронная почта: uzbekovmg@gmail.com

Поступила в редакцию 27.12.2022

После доработки 07.02.2023

Принята к публикации 07.02.2023

В обзоре приводятся данные о наличии синдрома эндогенной интоксикации у больных с психическими расстройствами. Приводятся данные, что окислительный стресс, средние молекулы, нарушение функциональных свойств альбумина крови и тиолов альбумина, нарушение состояния нейротропных факторов, повреждение активности ряда ферментов, включая моноаминоксидазу и семикарбазид-чувствительную аминоксидазу, способствуют развитию эндогенной интоксикации. Приводится схема возможных патогенетических механизмов развития эндогенной интоксикации при психической патологии и возможные пути ее преодоления.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эндогенная интоксикация, психические расстройства, окислительный стресс, средние молекулы, альбумин, ферменты, нейротропные факторы.

DOI: 10.31857/S032097252304005X, **EDN:** AKNWDD

ВВЕДЕНИЕ

Явления интоксикации сопровождаются заболеваниями, связанными с усиленными процессами катаболизма и гипоксией, нарушением процессов микроциркуляции, повышенным распадом тканей и накоплением в тканях и жидкостях организма различных соединений и метаболитов в избыточных концентрациях или формах, не свойственных нормальному метаболизму [1]. Симптомы интоксикации имеют общие черты и клинические проявления. Механизм развития этих симптомов практически идентичен [2]. При любой патологии синдром эндогенной интоксикации (эндотоксикоз) отягощает течение основного заболевания.

Ранее мы высказали гипотезу, что эндогенная интоксикация является интегральным компонентом патогенеза психических расстройств [1, 3, 4].

Механизмы развития эндогенной интоксикации можно подразделить на несколько групп [1, 4]. Укажем на некоторые из них.

Во-первых, это деструктивные процессы, в результате которых в организме накапливается избыточное количество промежуточных и конечных продуктов обмена веществ.

Во-вторых, нарушение и повреждение функционального состояния систем организма, которые предназначены для связывания, инактивации и выведения продуктов обмена веществ.

Третье – важной причиной интоксикации является повреждение барьерных систем, которые в нормальных условиях регулируют обмен различными веществами и соединениями между клеткой и кровью, клеткой и межклеточным пространством, препятствуют проникновению токсических продуктов в клетку.

Принятые сокращения: ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; МДА – малоновый диальдегид; MAO – моноаминоксидаза; ПОЛ – перекисное окисление липидов; СКР – свободные кислородсодержащие радикалы; СМ – средние молекулы; ЦНТФ – цилиарный нейротрофический фактор.

* Адресат для корреспонденции.

Далее, развитию эндотоксикоза способствуют нарушения эндокринной, иммунной и других систем организма.

Попытки выделить специфический для отдельных патологических состояний токсин или токсины до настоящего времени не увенчались успехом. При патологических состояниях в организме накапливается большое количество разнообразных промежуточных и конечных продуктов обмена, оказывающих повреждающее действие на органы и ткани.

Не поддающееся учету число веществ эндогенного происхождения, обладающих токсическими свойствами, и многообразие точек приложения их повреждающего действия предопределяет малую выраженность специфических и наличие общих клинических проявлений этого синдрома. Поэтому можно вести речь о неспецифическом синдроме эндогенной интоксикации, сопровождающем практически все заболевания, который сам по себе является важным фактором в патогенезе заболеваний.

Эндогенная интоксикация может проявлять себя на двух уровнях — метаболическом и клиническом.

Метаболический уровень эндотоксикоза характеризуется избыточным накоплением продуктов нормального и патологически извращенного метаболизма и обнаруживается при помощи биохимических и других лабораторных методов. Клинический уровень эндотоксикоза включает в себя как метаболические нарушения, так и различные клинические проявления в виде осложнений течения основного заболевания и побочных эффектов терапии.

О наличии синдрома эндогенной интоксикации свидетельствуют интегральные биологические тесты. Их особенностью является то, что они дают оценку не одной какой-либо биохимической или патофизиологической реакции, а охватывают какой-либо процесс или часть процесса. А это уже позволяет делать выводы о состоянии биологической системы или комплекса биологических и биохимических систем.

Однако, несмотря на важность проблемы, метаболическим основам и патогенетическим механизмам развития синдрома эндогенной интоксикации при психической патологии, так же, как и при других патологических состояниях, уделялось и уделяется недостаточное внимание.

В развитие эндогенной интоксикации и повреждение гомеостаза вносят вклад различные процессы, о которых будет сказано ниже.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

В развитие эндогенной интоксикации свой вклад вносит окислительный стресс.

Окислительный стресс — это нарушение прооксидантного/антиоксидантного баланса с превышением прооксидантного компонента. Окислительный стресс возникает, когда антиоксидантные защитные механизмы клетки не могут противостоять и контролировать уровень свободных кислородсодержащих (СКР) и свободных азотсодержащих (САР) радикалов, генерируемых в процессе нормального окислительного метаболизма или при нахождении в прооксидантной среде [5]. Связь между окислительным стрессом и патофизиологическими механизмами заболевания может быть объяснена физиологическим феноменом, обычно называемым «кислородным парадоксом» [6]. По этой концепции кислород играет две взаимопротивоположные роли: одна — кислород абсолютно необходим для жизни, тогда как вторая — кислород является токсической субстанцией [5, 6].

Свободные кислородные радикалы чрезвычайно активны, и поэтому попытки адаптационных механизмов организмов полностью нейтрализовать негативные стороны эффектов кислорода в эволюции не были достигнуты. В связи с этим наблюдается множество вредных воздействий, связанных с избыточной продукцией СКР. СКР способны вызывать повреждение мембранных структур, нарушение структуры и функции белков, денатурацию липидов и повреждение структуры нуклеиновых кислот. Эти повреждения особенно выражены в головном мозге, так как способность антиоксидантных систем нейронов противостоять свободнорадикальной атаке снижена [7].

Стресс является ответом на потенциально повреждающие стимулы. Острый стресс средней тяжести может быть полезен для повышения активности процессов, связанных с памятью, так же как для стимуляции пролиферации клеток гиппокампа и нейрогенеза. Однако хронический стресс вызывает пагубные повреждения в головном мозге [8]. Важную роль в патогенетических механизмах психических расстройств играет длительный стресс, что ведет к подавлению процессов пролиферации клеток и снижению нейрогенеза [9].

Стрессорные факторы внешней среды вызывают повреждения посредством нарушения иммунных и гормональных ответов, что ведет к нарушениям нейрогенеза и нейротрансмиссии. В конце концов это ведет к нейродегенеративным нарушениям [10].

Исследования подтверждают, что хронический стресс способствует развитию окислительного стресса в тех областях мозга, которые вовлечены в развитие психической патологии [11]. Биологические системы в процессе метаболизма генерируют продукты, избыточное образование которых может оказывать вредоносное воздействие на весь организм человека. При физиологических условиях содержание радикалов и антиоксидантов должно быть уравновешено. Окислительный стресс нарушает окислительно-восстановительные реакции и контролирующие их механизмы, что ведет к повреждению биологических молекул [12–14].

Свободные радикалы могут генерироваться в разных метаболических путях превращения различных соединений *in vivo*. В качестве их основных источников рассматриваются четыре: 1) перенос электронов в цепи терминального окисления в митохондриях; 2) перекисное окисление жирных кислот; 3) реакции, катализируемые цитохромом P-450; 4) фагоцитирующие клетки [15].

Ненасыщенные углеродные связи в холестерине и жирных кислотах мембран с высокой степенью готовности реагируют со свободными радикалами. Во время этой реакции образуются свободные перекисные радикалы, а сам процесс называется перекисным окислением липидов (ПОЛ). Особенно чувствительны к перекисному окислению полиненасыщенные жирные кислоты [16]. После инициирования процесс ПОЛ становится аутокаталитическим, и при этом образуются такие агрессивные соединения, как липидные перекиси, липид-алкоголи и разнообразные альдегиды.

Все три основных класса биологических макромолекул – липиды, нуклеиновые кислоты и белки – чувствительны к свободнорадикальной атаке. Например, основным эффектом перекисного окисления является снижение текучести мембран, которое нарушает их свойства и может значительно повреждать мембраносвязанные белки. Свободнорадикальная атака ведет к окислению сульфгидрильных (тиоловых) групп, восстановлению дисульфидных связей, образованию связей (сшивке) между белками, липидами и белками или липидами, фрагментации пептидов, повреждению, вплоть до инактивации, активных центров ферментов и т.д. Мутации клеток и их гибель в результате ионизирующей радиации в основном обязаны реакциям свободных радикалов с ДНК [16].

В ответ на перекисное окисление липидов происходят два процесса: структурные

повреждения мембран и генерация специфических эпитопов, возникших после их окисления. Эти эпитопы являются цитотоксическими вторичными продуктами перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот, как, например, 4-окси-2-ноненал (4-HNE) и малоновый диальдегид (МДА), которые являются провоспалительными соединениями. Образующиеся эпитопы чрезвычайно токсичны и оказывают разрушающее действие на биологические мембраны [17].

Эти молекулы служат непрямыми маркерами окислительного стресса у больных депрессией. Особенно это относится к повышенному уровню МДА, который вызывает повреждение белков и генерацию конечных продуктов липооксидации, имеющих провоспалительные свойства. Эти соединения обнаруживаются в сыворотке и плазме крови больных депрессией [18, 19].

Также повышенные концентрации других маркеров ПОЛ, которые служат в качестве DAMP-молекул (damage-associated molecular patterns), как, например, соединения, реагирующие с тиобарбитуровой кислотой, и 8-изопростагландин-F2a, выявляются в крови больных, а их уровни коррелируют с тяжестью депрессии [20].

Ядерная и митохондриальная ДНК могут быть повреждены при взаимодействии с СКР путем модификации оснований, повреждения и разрывов спиралей, потери пуриновых оснований, повреждения углеводных компонентов ДНК, перекрестного взаимодействия ДНК–белок, а также повреждения системы восстановления ДНК [5]. Все эти изменения ведут к нарушению генетической регуляции и могут индуцировать программированную клеточную смерть. Нейроны могут отвечать на повреждение ДНК торможением экспрессии пораженного геномного участка, который играет жизненно важную роль для выживания клеток. Трансформация одного из оснований ДНК ведет к образованию 8-оксидезоксигуанозина, который используется в качестве маркера повреждения ДНК в клинических условиях, и его содержание повышено у больных депрессией [21].

Избыточное укорочение теломер наблюдается при различных психических расстройствах – депрессиях и шизофрении – в сочетании со снижением активности теломеразы [22]. На большой когорте больных с аффективными расстройствами было выявлено усиленное укорочение теломер. Эти данные поддерживают гипотезу об ускорении клеточного старения при депрессии [22, 23]. В этом исследовании

была отмечена корреляция между уровнем окислительного стресса и степенью укорочения теломер. Это указывает на достоверный вклад окислительного стресса в повреждение теломер ДНК, что является важным детерминантом в процессе старения клеток у больных депрессией [24]. Длина теломер негативно коррелирует с длиной теломер у нелеченых больных депрессией и концентрацией интерлейкина-6 (IL-6). Точный механизм укорочения теломер и их роль в преждевременном старении при депрессии пока неизвестны [22].

Белки могут подвергаться прямому или непрямому воздействию окислительного стресса, включая переокисление, повреждение аминокислотной цепочки, их деградацию или фрагментацию, нарушение третичной структуры белков. В результате белки теряют свою функциональную или ферментативную активность, что влечет за собой нарушение их физиологических функций [5]. Интересным примером могут служить молекулы адгезии нервных клеток (NCAM), мембраносвязанные гликопротеины, которые экспрессируются на поверхности нейронов и глиальных клеток. Эти гликопротеины опосредуют взаимодействие между различными типами нейронов и играют важную роль в нейрогенезе фетального и взрослого мозга, регулируют пролиферацию, дифференциацию и выживание клеток. Важно, что многие белки служат в качестве вторичных мессенджеров. Функциональная модификация, которой подвергаются эти белки-мессенджеры, может нарушать физиологические функции нейронов [25].

Продуктом окисления полиненасыщенных жирных кислот является МДА, который способствует ослаблению антиоксидантной защиты. У пациентов с депрессией отмечают повышение концентрации МДА в сыворотке крови [26]. У больных депрессией по сравнению со здоровыми контролями в сыворотке крови повышена концентрация обоих маркеров окислительного стресса – F2-изопростана и 8-окси-20-дезоксигуанозина (8-OHdG). 8-OHdG является производным дезоксигуанозина, и его концентрация в клетках указывает на наличие окислительного стресса. Изопростаны образуются *in vivo* в процессе переокисления арахидоновой кислоты. Было установлено, что эти соединения являются индикаторами перекисного окисления липидов [21].

В литературе имеется большое количество работ, в которых установлена активация продукции свободных радикалов и процессов ПОЛ при психической патологии [9]. Было обнаружено повышение уровня гидропере-

кисей липидов и флуоресцирующих шиффовых оснований у больных шизофренией, содержание диеновых конъюгатов и МДА – при различных психоорганических заболеваниях, уровня шиффовых оснований, МДА и активности супероксиддисмутазы – при болезни Альцгеймера и поздней дискинезии, активности супероксиддисмутазы – у больных шизофренией и маниакально-депрессивным психозом [5, 27].

Нами были обследованы больные с эндогенными психозами (приступообразная шизофрения и маниакально-депрессивный психоз) с различными психопатологическими синдромами, резистентными к психофармакотерапии. В плазме крови у всех испытуемых было выявлено достоверное повышение по сравнению со здоровыми контролями уровня МДА. После проведения 1–3 сеансов плазмафереза у больных наблюдались отчетливые активирующий и психостимулирующий эффекты. Имевшиеся продуктивные психопатологические расстройства (депрессии, навязчивости, сенестопатии, бред, галлюцинации) исчезали. При этом содержание МДА в плазме крови снижалось практически до контрольных величин [28].

Таким образом, результаты наших исследований и данные литературы указывают на значительную активацию свободнорадикальных и перекисных процессов в организме больных с эндогенными психическими расстройствами с образованием веществ, оказывающих токсическое воздействие на процессы метаболизма. При адекватной терапии происходит нормализация процессов ПОЛ и в целом снижение уровня окислительного стресса, и уменьшение выраженности эндогенной интоксикации.

СРЕДНИЕ МОЛЕКУЛЫ

Средние молекулы (СМ) представляют собой фракцию различных соединений плазмы крови с молекулярным весом от 300 до 5000–6000 Да. (В англоязычной литературе для обозначения термина «средние молекулы» нами впервые в литературе был введен термин «middle-mass endotoxic molecules» [29].)

В составе СМ находят различные пептиды, гликопротеиды, продукты деградации альбумина, фибриногена, тромбина и других белков крови, некоторые гормоны и другие соединения – всего более 30 биологически активных веществ [30–32]. Пристальное внимание к СМ объясняется высокой биологической активностью их отдельных фракций,

которые способны ингибировать метаболизм различных соединений, нарушать процессы тканевого дыхания и мембранного транспорта, эритропоэз и микроциркуляцию, обладают иммунодепрессивными, цитотоксическими, нейро- и психотропными свойствами [30, 33]. Показано, что СМ проявляют свое токсическое действие в значительно более низких концентрациях, чем мочевина, мочевая кислота, ароматические амины и другие соединения [33]. Подчеркнем, что СМ в плазме крови отражают процессы катаболизма, а при патологических состояниях – процессы деструкции, которые имеют место в клетках организма.

Несмотря на то что СМ проявляют психотропную активность, публикации, связанные с изучением их роли при психической патологии, единичны. Было установлено, что больные прогрессивной параноидной шизофренией характеризуются достоверно повышенным уровнем СМ по сравнению со здоровыми контролями [34].

Мы попытались сопоставить клинические данные и показатели уровня СМ, чтобы более объективно оценить выраженность эндотоксикоза и проследить терапевтическую динамику у больных с различными резистентными к психофармакотерапии формами параноидной шизофренией при проведении плазмафереза. Было выявлено, что исходное (до лечения) содержание СМ в плазме крови больных достоверно, более чем в 3 раза, превышало контрольные величины. После сеансов плазмафереза наблюдалось улучшение клинического состояния и статистически значимое снижение ($p < 0,05$) уровня СМ в плазме у всех обследованных больных, которое, однако, было более чем в 2 раза выше контрольных величин (0,45 г/литр). Мы считаем, что при ухудшении состояния больных и развитии психофармакологической резистентности в головном мозге усиливаются катаболические процессы и, в частности, процессы протеолиза, приводящие к увеличению концентрации пептидов с различной молекулярной массой. Нельзя упускать из вида, что все вышесказанное происходит на фоне активации окислительного стресса и свободнорадикальных процессов [28].

Можно предположить, что в головном мозге больных эндогенными психозами происходит накопление «патологических» компонентов фракции СМ, что в конечном итоге и инициирует развитие эндотоксикоза. Последнее было подтверждено в нашей работе. Сыворотка крови больных с тяжелой формой параноидной шизофрении, резистентной к психофармакотерапии, была подвергнута

фракционированию методом высокоэффективной жидкостной хроматографии до и после проведения курса плазмафереза. Было обнаружено, что до начала лечения во фракции СМ присутствуют 2 дополнительных компонента. После курса плазмафереза на фоне улучшения психического статуса эти дополнительные компоненты исчезали, а общее содержание СМ снижалось [35].

Нами было установлено более чем двукратное повышение уровня средних молекул у больных первого эпизода шизофрении [36] и у больных тревожной депрессией [29]. Проведенная адекватная антипсихотическая и антидепрессивная терапия способствовала улучшению состояния больных, что сопровождалось снижением уровня СМ [29, 36].

Таким образом, снижение уровня СМ в плазме после соответствующей терапии в сочетании со значительным улучшением клинического и психического статуса больных можно рассматривать как уменьшение степени эндотоксикоза и тенденцию к нормализации гомеостаза в целом. Определение уровня СМ является в достаточной мере адекватным параметром, отражающим выраженность эндотоксикоза, и их уровень может служить прогностическим биомаркером. Следует подчеркнуть, что метод определения уровня средних молекул является сравнительно простым и может использоваться практически в любой клинико-диагностической лаборатории.

Анализ собственных и литературных данных позволяет считать, что уровень СМ в сыворотке крови у больных людей является интегральным компонентом выраженности эндогенной интоксикации.

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА АЛЬБУМИНА

При подавляющем большинстве заболеваний происходит избыточное накопление токсических метаболитов в организме. Одним из универсальных механизмов реакции организма на увеличение продуктов метаболизма является образование комплексов различных соединений с белками плазмы крови [37, 38]. Уникальной способностью к комплексообразованию обладает сывороточный альбумин. Для оценки функциональных свойств альбумина мы использовали флуоресцентный метод, позволяющий определить связывающую способность альбумина. Метод стационарной флуоресцентной спектроскопии основан на использовании флуоресцентного зонда К-35.

Альбумин является единственным белком сыворотки крови, с которым специфически связывается зонд К-35 [39, 40].

При помощи метода стационарной флуоресцентной спектроскопии мы показали, что шизофрения, различные типы стресса сопровождаются конформационными изменениями альбумина сыворотки крови [39, 41].

Метод стационарной флуоресцентной спектроскопии вместе с тем не давал информацию о природе конформационных изменений в молекуле альбумина. Более того, при исследовании альбумина больных с первым эпизодом шизофрении мы не зарегистрировали каких-либо изменений в конформации этого белка, хотя некоторые другие нейрохимические параметры уже были изменены так же, как и при хронической шизофрении [36]. Это позволило нам предположить, что у больных первого эпизода шизофрении имеются нарушения в молекуле альбумина, но метод стационарной флуориметрии не обладает достаточной чувствительностью для обнаружения таких очень тонких изменений. Сотрудники Московского НИИ психиатрии, НИИ физико-химической медицины МФБА, Физического института им. П.Н.Лебедева РАН (Москва) и Российского федерального ядерного Центра – ВНИИ экспериментальной физики (Саров) – сконцентрировали свои усилия на создании новых технологических подходов для исследования альбумина крови человека [42, 43]. Был разработан метод, основанный на анализе кинетики затухания флуоресцентного зонда в субнаносекундном диапазоне, присоединенного к молекуле альбумина крови у лиц, страдающих психическими расстройствами. Использование разрешенной во времени флуоресцентной спектроскопии позволило избирательно следить за состоянием главных связывающих центров альбумина.

Для выявления таких тонких изменений была использована специфическая техника, базирующаяся на нанотехнологических принципах: специальные молекулярные флуоресцентные зонды и регистрация затухания их флуоресценции в диапазоне времен 10^{-11} – 10^{-9} секунд с разрешением в 33 пикосекунды (нано- и пикосекундная флуоресцентная спектроскопия). Флуоресцентный зонд К-35, избирательно связывающийся в плазме или сыворотке крови практически только с альбумином, имеет размер около 1,5 нанометров и хорошо встраивается в специальные участки его молекулы [44].

После возбуждения импульсами лазерного источника молекул зонда, связанных с сывороточным альбумином, возникает не менее

трех типов флуоресцирующих молекул. То есть зонд К-35 связывается с тремя связывающими центрами на молекуле альбумина с амплитудой затухания флуоресценции в 9, 3 и 1 наносекунды. Эти центры были обозначены как центры «9», «3» и «1» наносекунд. При измерении затухания флуоресценции получается более многогранная картина состояния связывающих центров альбумина, чем при стационарной флуориметрии. Вместо одного суммарного, усредненного показателя – «эффективная концентрация альбумина» – мы видим состояние трех главных связывающих центров альбумина и их возможные изменения при патологических процессах [44].

Так, у больных первого эпизода шизофрении нами были установлены достоверные изменения во втором типе связывающих центров для К-35 («3 наносекунды») по сравнению со здоровыми контролями. Для выявления различий между свойствами связывающих центров в этих группах применяли дополнительную нагрузку на молекулу альбумина. В качестве провоцирующих факторов использовали изменения ионной силы среды. Оказалось, что глобула альбумина сыворотки больных первого эпизода шизофрении и здоровых различно реагирует на увеличение ионной силы раствора. У больных первого эпизода шизофрении показатель, характеризующий центр «3 наносекунды», был достоверно ниже, чем в группе здоровых добровольцев [42].

Анализ всех параметров затухания флуоресценции зонда К-35 в сыворотке крови контролей и больных с меланхолической депрессией показал, что до начала антидепрессивной терапии средние значения амплитуд 9, 3 и 1 наносекунды в сыворотке пациентов были достоверно ($p = 0,025$) выше, чем в группе контроля.

Таким образом, можно полагать, что изменение конформационных, физико-химических свойств альбумина влечет за собой нарушение одного из важнейших его функциональных свойств – транспортного, что сопровождается избыточным нарастанием уровня метаболитов в крови [45]. Это вносит значительный вклад в интенсификацию эндогенной интоксикации.

ТИОЛЫ АЛЬБУМИНА

Большой интерес представляет состояние систем защиты против возникающей интоксикации и развивающегося окислительного стресса у больных с психической патологией.

Альбумин плазмы крови имеет одну восстановленную тиоловую (SH-группу) в положении Суs34. При физиологических условиях

до 80% всех определяемых высокомолекулярных тиолов плазмы составляют именно тиолы альбумина [46].

Считается, что альбумин вовлечен в реакции с участием свободных радикалов не специфически, а в силу того, что его концентрация во внеклеточном пространстве высока и его обмен происходит относительно быстро (около 20 дней) [47].

При обрыве цепи свободнорадикального окисления эта тиоловая группа окисляется безвозвратно.

Выполнение альбумином антиоксидантной функции зависит не только от его восстановленных тиолов, но и от конформационного состояния молекулы альбумина [48]. Таким образом, состояние тиоловой группы альбумина может выступать маркером его конформационных изменений, которые в итоге скажутся на выполнении альбумином его антиоксидантной функций.

В связи с этим изучение концентрации тиоловых групп и реакционной способности SH-групп альбумина при различных патологических процессах представляет существенный интерес не только как фактор антиоксидантной защиты, но и как важное звено метаболических процессов в организме.

Концентрация и реакционная способность тиоловых групп альбумина – активных участников оксидативных процессов в сыворотке крови при психических заболеваниях – ранее никем не определялись. Однако нарушение этого звена окислительно-восстановительных процессов у психически больных, возможно, играет роль в развитии метаболических нарушений, которые были определены ранее как синдром эндогенной интоксикации.

Было выявлено, что концентрации восстановленных тиоловых групп альбумина у здоровых лиц и больных с первым эпизодом шизофрении достоверно не различаются.

Реакционная способность SH-групп (K_V) характеризует скорость вступления в реакцию тиол-дисульфидного обмена неокисленных (нативных, восстановленных) тиолов альбумина, аналогичная реакция происходит в организме при свободнорадикальном окислении.

При исследовании реакционной способности SH-групп, оставшихся восстановленными в альбуминовой фракции исходной сыворотки крови, было обнаружено достоверное снижение константы скорости реакции (K_V) в группе больных с первым эпизодом шизофрении, что свидетельствует о снижении антиоксидантной активности тиоловых групп альбумина у таких больных.

Таким образом, первый эпизод шизофрении сопровождается изменением реакционной способности альбумина сыворотки крови, что может повлиять на свободнорадикальные процессы в организме пациентов [49].

Альбумин составляет более половины всех белков сыворотки крови, участвует в транспорте многих соединений и в защите организма от свободнорадикального окисления.

Однако выполнение альбумином антиоксидантной функции зависит не только от доли его восстановленных тиолов, но и от конформационного состояния молекулы альбумина. SH-группа находится в молекуле альбумина в некоем углублении (назовем его «карманом») [50]. Если конформация молекулы такова, что этот «карман» не доступен для взаимодействия с молекулами-мишенями (например, свободными радикалами), то, несмотря на наличие восстановленной SH-группы, молекула не будет участвовать в окислительно-восстановительных реакциях. Если же молекула развернута настолько, что SH-группа становится доступной для взаимодействия при малейшей концентрации свободных радикалов, то в итоге почти весь пул тиолов альбумина окажется способным к окислению. Кроме того, свойства тиоловой группы альбумина могут выступать маркерами его конформационных изменений [49].

Ранее нами были показаны выраженные метаболические нарушения у больных первого эпизода шизофрении, которые в том числе затрагивают свойства связывающих центров и конформацию молекулы сывороточного альбумина.

Нарушение функций альбумина может оказывать значительное влияние на изменение окислительно-восстановительных процессов в организме и нарастание выраженности эндогенной интоксикации [2].

НЕЙРОТРОПНЫЕ ФАКТОРЫ

Нейротропные факторы – это большая группа белков, включающая в себя такие факторы, как мозговой нейротрофический фактор (BDNF), глиофибрилярный кислый белок (GFAP), фактор роста нервов (NGF), цилиарный нейротрофический фактор (CNTF, ЦНТФ) и ряд других. Главной их особенностью является способность контролировать развитие нервной системы, миграцию и дифференциацию нервных клеток. Их сигнальные пути и функции во многом перекрываются между собой. Нейротрофины играют жизненно важные роли в развитии нервной системы.

Цилиарный нейротрофический фактор является цитокином с молекулярной массой 22 кДа, принадлежит к семейству интерлейкинов-6 (IL-6) и экспрессируется преимущественно глиальными клетками центральной и периферической нервных систем [51]. ЦНТФ – нейротрофин, который может выполнять функции нейропротективного агента [52]. Он играет важную роль в регуляции нейронального развития, нейропротекции и может влиять на когнитивные процессы. Однако физиологическое значение ЦНТФ, циркулирующего в крови, до настоящего времени не ясно.

В лаборатории патологии мозга Московского НИИ психиатрии было проведено исследование уровня цилиарного нейротрофического фактора при меланхолической депрессии. Содержание ЦНТФ в крови больных меланхолической депрессией определяли до начала психофармакотерапии. У больных уровень ЦНТФ был достоверно выше, чем у здоровых добровольцев [53]. Имеются данные, что депрессия сопровождается повреждением проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) [54]. Мы полагаем, что при патологических условиях ЦНТФ синтезируется и секретируется в ткани головного мозга в больших количествах, чем в норме, но не проявляет нейропротективные свойства, так как немедленно выводится в кровеносное русло через поврежденный ГЭБ [53].

Наши предварительные исследования подтвердили это предположение. Проведенная антидепрессивная терапия венлафаксином не оказала влияния на содержание ЦНТФ в сыворотке крови больных: уровень этого нейротрофического фактора после фармакотерапии был практически таким же, как и у больных при поступлении в клинику, что указывает на отсутствие влияния антидепрессанта – венлафаксина – на восстановление функции ГЭБ.

Следует отметить, что судьба ЦНТФ, выделенного в кровь, неизвестна. Мы полагаем, что ЦНТФ в крови подвергается деградации с образованием значительного числа пептидных фрагментов, которые могут обладать токсическими свойствами, вносящими свой вклад в интенсификацию эндогенной интоксикации.

ФЕРМЕНТЫ И ИХ ВКЛАД В ВЫРАЖЕННОСТЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

В проблеме эндотоксикоза особое место занимает моноаминоксидаза (МАО). Этот фер-

мент связан с дезаминированием моноаминовых нейромедиаторов (катехол- и индоламинов) и отражает состояние моноаминергических нейромедиаторных систем [55].

Так, нами было показано, что у больных хронической шизофренией [56], первым эпизодом шизофрении [36], тревожной депрессией [29] активность МАО тромбоцитов была повышена на 100% и более. Как указывается в литературе [55, 57], активность МАО тромбоцитов может отражать активность МАО в головном мозге.

Явления, связанные с повышением активности МАО, рассматриваются нами с нескольких точек зрения. Во-первых, МАО является интегральным компонентом наружной митохондриальной мембраны. Нарушение активности МАО при эндогенных расстройствах указывает на то, что эти патологические состояния сопровождаются повреждением мембранных структур и появлением в крови различных токсичных продуктов [27]. Аккумуляция этих соединений в крови вносит вклад в увеличение уровня средних молекул и повышение степени эндотоксикоза.

Во-вторых, повышение активности МАО сопровождается увеличением продукции перекиси водорода. Известно, что перекись водорода, образуемая в реакциях дезаминирования, катализируемых МАО (через реакцию Фентона), является основным источником свободных радикалов в головном мозге [15]. Следовательно, увеличение активности МАО при психической патологии активирует свободно-радикальные реакции и процессы ПОЛ. Кроме того, высокая активность МАО способствует повышению в крови и тканях уровня токсических соединений (альдегиды и аммиак), образующихся в реакции дезаминирования.

Все вышесказанное указывает, что нарушение активности МАО вносит значительный вклад в выраженность эндотоксикоза.

Ксантиноксидаза является ферментом, катализирующим окисление ксантина. Продуктами этой реакции являются супероксидный анион-радикал и перекись водорода. В сыворотке крови больных депрессией было установлено достоверное повышение активности ксантиноксидазы сыворотке крови по сравнению с контролем [58, 59]. Эти результаты подтверждаются данными о повышении активности ксантиноксидазы в различных областях постмортального мозга больных депрессией [60].

В реакциях, катализируемых NADPH-оксидазой, образуются супероксидные анион-радикалы. В нейронах NADPH-оксидаза поло-

жительно коррелирует с процессами воспаления. Процессы воспаления индуцируют активацию микроглиальной NADPH-оксидазы и синтазы окиси азота, которые действуют синергично, при этом образуется пероксинитрит, под действием которого происходит гибель нейронов. Пероксинитрит является мощным оксидантом, и по своему биологическому действию он аналогичен гидроксильному радикалу. Нарушения активности NADPH-оксидазы были отмечены при депрессии и шизофрении [59].

Аминокислота триптофан, предшественник в синтезе серотонина, метаболизируется в кинуренин под действием фермента индоламин-2,3-диоксигеназы. На путях обмена кинуренина образуются такие соединения, как 3-оксикинурины и хинолиновая кислота, повышенный уровень которых с одновременным повышением активности индоламин-2,3-диоксигеназы является характерным для депрессии. Метаболиты триптофана — кинуренин, кинуреновая кислота и ксантуреновая кислота, обладают депрессогенными, анксиогенными и нейротоксическими свойствами [61, 62].

СЕМИКАРБАЗИД-ЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ АМИНОКСИДАЗА

Семикарбазид-чувствительная аминоксидаза (САО) сыворотки крови является ферментом, который по целому ряду свойств отличается от моноаминоксидазы [63]. Высказываются предположения, что САО принимает участие в окислении ряда ксенобиотиков, например, различных фармакологических препаратов. Ряд эндогенных метаболитов — эндометаболитов, таких как полиамины (спермин и спермидин), аминокетон, синтезирующийся из L-треонина, — являются субстратами этого фермента. Продукты дезаминирования полиаминов и аминокетона — акролеин и метилглиоксаль соответственно — являются канцерогенными и цитотоксическими соединениями [64]. Показано нарушение активности этого фермента при ряде заболеваний человека — злокачественные опухоли, диабет, заболевания сердца, ожоговая болезнь [65]. Активность этого фермента при психической патологии практически не изучалась.

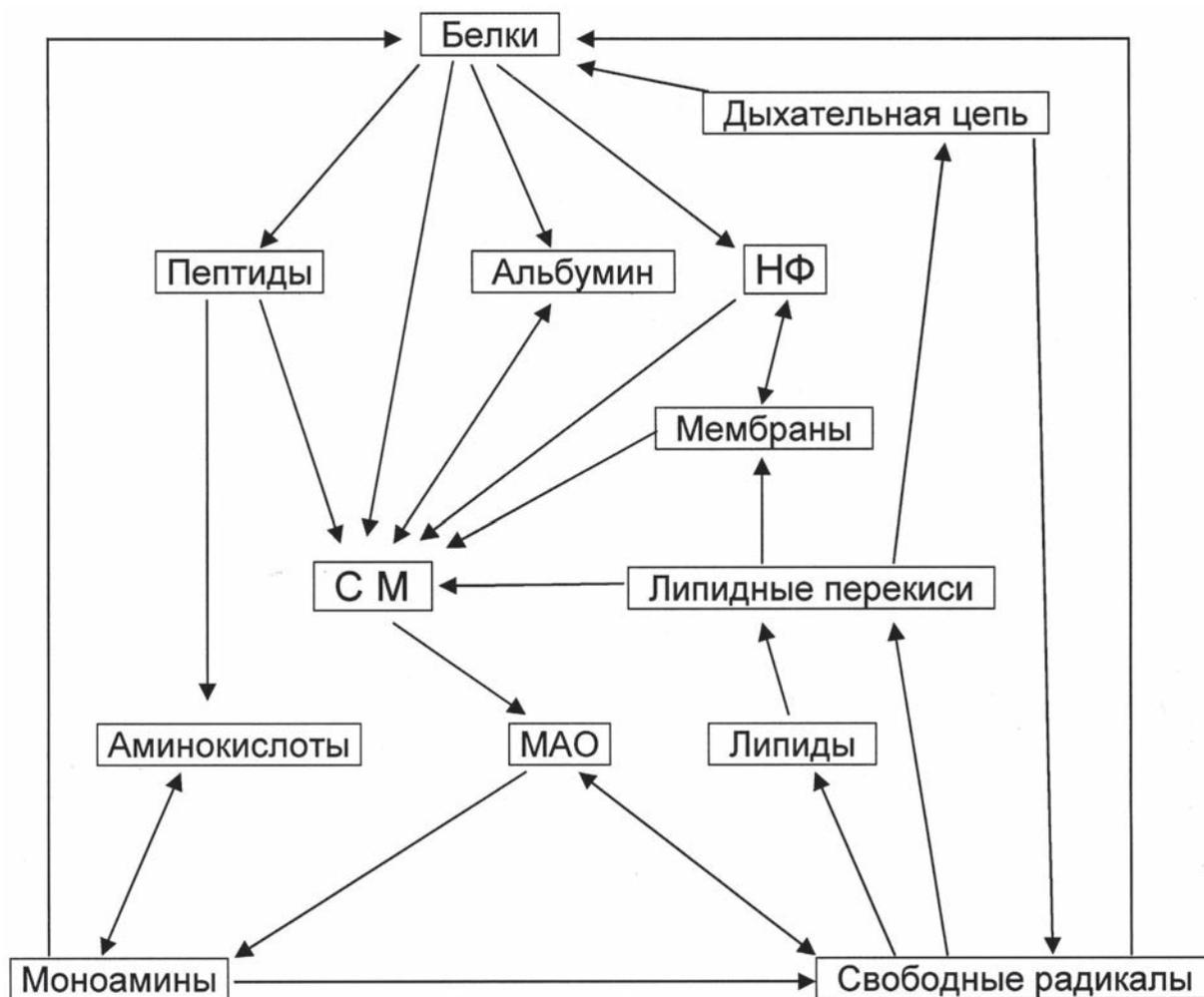
В наших исследованиях было установлено, что тревожная депрессия [29] и первый эпизод шизофрении [36, 41] сопровождались достоверным снижением активности фермента — приблизительно на 30–40% по сравнению со здоровыми контролями. Мы полагаем, что выраженное накопление в крови эндометабо-

ликов может вносить существенный вклад в развитие эндогенной интоксикации.

ВОЗМОЖНЫЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ И СПОСОБЫ ЕЕ ПРЕОДОЛЕНИЯ

Данные литературы и результаты наших исследований позволили нам разработать схему возможных патогенетических механизмов развития эндогенной интоксикации при психической патологии (рисунок). Это замкнутая цепь превращений, в которой нарушение любого звена вызывает каскад дальнейших патологических нарушений. Через звено моноамины — MAO — эта патологическая цепь взаимосвязана с общим патогенетическим развитием эндогенных психозов (шизофрения и депрессии). Так, нарушение обмена биогенных моноаминов (и особенно дофамина) и активности MAO ведет к избыточной генерации свободных радикалов. Установлено, что катехоламины (и особенно дофамин) принимают участие в регуляции обмена белков. Активация процессов катаболизма вызывает увеличение содержания фракции СМ. Это связано с усилением процессов протеолиза как свободных белков, так и белков, являющихся структурными компонентами мембран, что приводит к выраженному повышению концентрации пептидов с различной молекулярной массой [30], а также к появлению патологических компонентов фракции СМ [35].

Нами было установлено достоверное повышение уровня ЦНТФ у больных меланхолической депрессией. Лечение этих больных антидепрессантами не оказало влияние на содержание ЦНТФ в сыворотке крови; оно было таким же, как и у больных до проведения лечения. Было высказано предположение, что у больных депрессией поврежден гематоэнцефалический барьер и что лечение антидепрессантами не оказывало влияния на функциональное состояние ГЭБ [53]. Выдвинутое нами предположение о нарушении состояния ГЭБ у больных меланхолической депрессией и повышении его проницаемости косвенно подтвердилось следующими результатами. У больных эпилепсией включение в терапевтический процесс цитиколина, ноотропного препарата, содержащего в своем составе фосфатидилхолин, способствовало статистически значимому снижению повышенного уровня ЦНТФ в сыворотке крови, что сопровождалось улучшением клинического статуса больных [66].



Гипотетическая модель развития эндогенной интоксикации. СМ – Средние молекулы; МАО – моноаминоксидаза; НФ – нейротропные факторы

Это означает, что цитиколин способствовал определенному восстановлению нарушенной структуры мембран, что сопровождалось снижением утечки ЦНТФ из паренхимы мозга.

Повреждения белковых компонентов мембран, а также метаболическая гипоксия, наблюдающаяся у больных, способствуют нарушению процессов окислительного фосфорилирования (терминальное окисление) в митохондриях. Известно, что гипоксия индуцирует повышение степени восстановленности некоторых переносчиков электронов в цепи терминального окисления, что приводит к избыточной продукции свободных радикалов [67]. Повышение продукции свободных радикалов инициирует процессы перекисного окисления липидов со всеми вытекающими из этого разрушительными процессами [68], такими как нарушение функции белков, ферментов, рецепторов и т.д. Липидные гидроперекиси, нарушая свойства альбумина, изменяя его конформацию, снижают деток-

сикационные и антиоксидантные функции этого белка, усугубляют выраженность эндотоксикоза. В свою очередь, повышение уровня фракции СМ и появление в ней «патологических» компонентов могут оказать негативное влияние на активности ферментов (МАО) и функции альбумина. Прогрессирование основного заболевания способствует активации функционирования «порочного круга» и усилению выраженности эндотоксикоза.

По нашему мнению, предложенная схема не только позволяет объяснить механизмы развития эндотоксикоза, но и указывает на определенные пути «разрыва» этого «порочного круга» и снижения выраженности интоксикации. Теоретически возможными путями фармакологического воздействия могли бы быть следующие шаги: звено МАО (моноамины) – ингибиторы моноаминоксидазы; звено свободные радикалы (липидные перекиси) – различные антиоксиданты; звено пептиды–белки–СМ – ингибиторы протеолиза; звено дыхательная

цепь – корректоры энергетического метаболизма; восстановление функционального состояния мембран, в том числе и ГЭБ – корректоры состояния мембран (цитиколин).

Благодарности. Выражаю сердечную благодарность моим коллегам, которые на разных этапах принимали участие в проведении исследований: докторам наук Грызунову Ю.А., Гуровичу И.Я., Добрецову Г.Е., Ивановой С.А., Краснову В.Н., Шмуклеру А.Б.; кандидатам наук Максимовой Н.М., Мисионжнику Э.Ю., Смолиной Н.В., Шихову С.Н.; м.н.с. Бриллиантовой В.В., Скокиной Е.Б.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследованиях с участием людей, проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией об этических принципах проведения медицинских исследований с участием людей, этическими стандартами Национального комитета по исследовательской этике и заключениями локального этического комитета Московского НИИ психиатрии. От каждого из включенных в исследование участников было получено письменное информированное согласие на участие в исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Узбеков М. Г., Мисионжник Э. Ю. (2000) Неспецифический синдром эндогенной интоксикации как интегральный компонент патогенеза психических расстройств, *Росс. Психиатр. Журн.*, **4**, 56–65.
2. Узбеков М. Г., Гурович И. Я., Иванова С. А. (2016) Потенциальные биомаркеры психических заболеваний в аспекте системного подхода, *Соц. Клин. Психиатр.*, **26**, 98–109.
3. Stober, G., Ben-Shachar, D., Cardon, M., Falkai, P., Fonteh, A. N., Gawlik, M., Glenthøj, B., Grunblatt, E., Jablensky, A., Kim, Y.-K., Kornhuber, J., McNeil, T., Müller, N., Oranje, B., Saito, T., Saoud, M., Schmitt, A., Schwartz, M., Thome, J., Uzbekov, M., Durany, N., and Riederer, P. (2009) Schizophrenia: from the brain to peripheral markers – a consensus paper of the WFSBP Task Force on biological markers, *World J. Biol. Psychiatry*, **10**, 127–155, doi: 10.1080/15622970902898980.
4. Узбеков М. Г. (2019) Эндогенная интоксикация и ее роль в патогенетических механизмах психических расстройств, *Соц. Клин. Психиатр.*, **29**, 14–20.
5. Kohen, R., and Nyska, A. (2002) Invited review: oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification, *Toxicol. Pathol.*, **30**, 620–650, doi: 10.1080/01926230290166724.
6. Davies, K. J. (1995) Oxidative stress: the paradox of aerobic life, *Biochem. Soc. Symp.*, **61**, 1–31, doi: 10.1042/bss0610001.
7. Mehta, S. L., Kumari, S., Mendeleev, N., and Li, P. A. (2012) Selenium preserves mitochondrial function, stimulates mitochondrial biogenesis, and reduces infarct volume after focal cerebral ischemia, *BMC Neurosci.*, **13**, 79, doi: 10.1186/1471-2202-13-79.
8. Wong, E. Y. H., and Herbert, J. (2004) The corticoid environment: A determining factor for neural progenitors' survival in the adult hippocampus, *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 2491–2498, doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03717.x.
9. Juszczak, G., Mikulska, J., Kasperek, K., Pietrzak, D., Mrozek, W., and Herbet, M. (2021) Chronic stress and oxidative stress as common factors of the pathogenesis of depression and Alzheimer's disease: the role of antioxidants in prevention and treatment, *Antioxidants*, **10**, 1439–1470, doi: 10.3390/antiox10091439.
10. Jesulola, E., Micalos, P., and Baguley, I. (2017) Understanding the pathophysiology of depression: from monoamines to the neurogenesis hypothesis model – are we there yet? *Behav. Brain Res.*, **341**, 25–38, doi: 10.1016/j.bbr.2017.12.025.
11. Sies, H., Berndt, C., and Jones, D. P. (2017) Oxidative stress, *Ann. Rev. Biochem.*, **86**, 715–748, doi: 10.1146/annurev-biochem-061516-045037.
12. Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., and Bitto, A. (2017) Oxidative stress: harms and benefits for human health, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2017**, e8416763, doi: 10.1155/2017/8416763.
13. Wojsiat, J., Zoltowska, K. M., Laskowska-Kaszub, K., and Wojda, U. (2018) Oxidant/antioxidant imbalance in Alzheimer's disease: the therapeutic and diagnostic prospects, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2018**, 6435861, doi: 10.1155/2018/6435861.
14. Узбеков М. Г. (2022) Окислительный стресс и депрессия: вопросы патогенеза, *Соц. Клин. Психиатр.*, **32**, 73–81.
15. Halliwell, B. H., and Gutteridge, J. M. (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Fourth Edition, Oxford, Oxford Univ. Press.
16. Узбеков, М.Г. (2015) Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психических заболеваниях. Сообщение II, *Соц. Клин. Психиатрия*, **25**, 92–101.
17. Ayala, A., Munoz, M. F., and Argüelles, S. (2014) Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and

- 4-hydroxy-2-nonenal, *Oxid. Med. Cell. Longev*, **2014**, 360438, doi: 10.1155/2014/360438.
18. Gałeczki, P., Szemraj, J., Bienkiewicz, M., Zboralski, K., and Gałeczka, E. (2009) Oxidative stress parameters after combined fluoxetine and acetylsalicylic acid therapy in depressive patients, *Hum. Psychopharmacol.*, **24**, 277-286, doi: 10.1002/hup.1014.
19. Maes, M., Mihaylova, I., Kubera, M., Uytterhoeven, M., Vrydags, N., and Bosmans, E. (2011) Lower whole blood glutathione peroxidase (GPX) activity in depression, but not in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: another pathway that may be associated with coronary artery disease and neuroprogression in depression, *Neuroendocrinol. Lett.*, **32**, 133-140.
20. Yager, S., Forlenza, M. J., and Miller, G. E. (2010) Depression and oxidative damage to lipids, *Psychoneuroendocrinology*, **35**, 1356-1362, doi: 10.1016/j.psyneuen.2010.03.010.
21. Forlenza, M. J., and Miller, G. E. (2006) Increased serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical depression, *Psychosom. Med.*, **68**, 774-780, doi: 10.3109/15622971003797241.
22. Verhoeven, J. E., Revesz, D., Epel, E. S., Lin, J., Wolkowitz, O. M., and Penninx, B. W. (2014) Major depressive disorder and accelerated cellular aging: results from a large psychiatric cohort study, *Mol. Psychiatry*, **19**, 895-901, doi: 10.1038/mp.2013.151.
23. Simon, N. M., Smoller, J. W., McNamara, K. L., Maser, R. S., Zalta, A. K., Pollack, M. H., Nierenberg, A. A., Fava, M., and Wong, K. K. (2006) Telomere shortening and mood disorders: preliminary support for a chronic stress model of accelerated aging, *Biol. Psychiatry*, **60**, 432-435, doi: 10.1016/j.biopsych.2006.02.004.
24. Kawanishi, S., and Oikawa, S. (2004) Mechanism of telomere shortening by oxidative stress, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1019**, 278-284, doi: 10.1196/annals.1297.047.
25. Bakunina, N., Pariante, C. M., and Zunszain, P. A. (2015) Immune mechanisms linked to depression via oxidative stress and neuroprogression, *Immunology*, **144**, 365-373, doi: 10.1111/imm.12443.
26. Gałeczki, P., Szemraj, J., Bienkiewicz, M., Florkowski, A., and Gałeczka, E. (2009) Lipid peroxidation and antioxidant protection in patients during acute depressive episodes and in remission after fluoxetine treatment, *Pharmacol. Rep.*, **61**, 436-447, doi: 10.1016/s1734-1140(09)70084-2.
27. Прилипко Л. Л., Ерин А. Н., Беляев Б. С., Пятницкий А. Н., Сюняков С. А., Пантелева Г. П., Пантелева, Г. П., Цуцельковская, М. Я., Лидеман, Р. Р. (1987) Активация перекисного окисления липидов в организме больных шизофренией и маниакально-депрессивным психозом, *Журн. Неврол. Психиатр. им. С.С. Корсакова*, **1**, 100-103.
28. Узбеков М. Г., Мисионжник Э. Ю., Малин Д. И., Недува А. А. (1997) Изменение уровня средних молекул и некоторых других биохимических показателей у больных эндогенными психозами при проведении плазмафереза, *Соц. Клин. Психиатр.*, **7**, 93-99.
29. Uzbekov, M., Misionzhnik, E., Maximova, N., and Vertogradova, O. (2006) Biochemical profile in patients with anxious depression under the treatment with serotonergic antidepressants with different mechanisms of action, *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*, **21**, 109-115, doi: 10.1002/hup.749.
30. Ringoir, S., Vanholder, R., and Massry, S. G. (1987) *Uremic Toxins*, New York—London, Academic Press.
31. Николайчик В. В., Моин В. М., Кирковский В. В., Мазур Л. И., Лобачева Г. А., Бычко Г. Н., Бараташвили Г. Г. (1991) Способ определения «средних молекул», *Лаб. Дело*, **10**, 13-18.
32. Чаленко В. В. (1991) Возможные причины повышения концентрации средних молекул в патологии, *Патол. Физиол. Эксп. Тер.*, **4**, 13-14.
33. Тупикова З. А. (1983) Средне-молекулярные уремиические токсины (обзор литературы), *Вопр. Мед. Хим.*, **1**, 2-10.
34. Туряница И. М., Мишанич И. И., Росток Л. М. (1988) Спектр средних молекул в сыворотке крови больных с непрерывной формой параноидной шизофрении в процессе лечения, *Журн. Неврол. Психиатр. им. С.С. Корсакова*, **88**, 109-111.
35. Шихов С. Н., Узбеков М. Г., Малин Д. И. (2000) Изменения спектра «средних молекул» у больных депрессивными расстройствами при проведении плазмафереза, *Материалы 13-го съезда психиатров России*, 373-374.
36. Узбеков М. Г., Мисионжник Э. Ю., Шмуклер А. Б., Гурович И. Я., Грызунов Ю. А., Смолина Н. В., Калинина В. В., Соколова Т. Н., Москвитина Т. А., Шевченко В. А. (2009) Нарушение активности моноаминоксидазы и показателей эндогенной интоксикации у больных с первым эпизодом шизофрении, *Журн. Неврол. Психиатр. им. С.С. Корсакова*, **109**, 48-52.
37. Грызунов Ю. А., Добрецов Г. Е. (1994) *Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. Кн. 1*, Ириус, Москва.
38. Грызунов Ю. А., Добрецов Г. Е. (1998) *Альбумин сыворотки крови в клинической медицине. Кн. 2*, ГЭОТАР, Москва.
39. Грызунов Ю. А., Мисионжник Э. Ю., Узбеков М. Г., Молодецких А. В. (1994) Влияние терапии галоперидолом на динамику показателей связывающей способности альбумина сыворотки крови у больных шизофренией, *Клин. Лаб. Диагн.*, **5**, 31-33.
40. Моин В. М., Мисионжник Э. Ю., Кузнецова З. И., Грызунов Ю. А., Кирковский В. В., Узбеков М. Г., Зубовский Д. И. (1994) Некоторые характеристики метода и реактивов для флуоресцентного определения эффективной и общей концентрации сывороточного альбумина, *Клин. Лаб. Диагн.*, **5**, 33-35.

41. Uzbekov, M. G., Misionzhnik, E. Yu., Gurovich, I. Y., and Shmukler, A. B. (2013) Aspects of metabolic changes in first-episode drug-naïve schizophrenic patients, *Acta Neuropsychiatr.*, **25**, 268-274, doi: 10.1017/neu.2013.1.
42. Узбеков М. Г., Сырейщикова Т. И., Бабушкина Т. А., Смолина Н. В., Калинина В. В., Добрецов Г. Е., Климова Т. П., Перегудов А. С., Мисионжние Э. Ю., Токарев В. А. (2013) Высокотехнологические подходы позволяют выявить конформационные изменения в молекуле альбумина у больных первого эпизода шизофрении, *Сиб. Вестник Психиатр. Наркол.*, **1**, 26-30.
43. Smolina, N., Gryzunov, Yu., Syreishchikova, T., Uzbekov, M., Dobretsov, G., Misionzhnik, E., Komar, A., and Tokarev, V. (2009) Albumin binding sites in first-episode drug-naïve patients with paranoid schizophrenia studied by subnanosecond fluorescence spectroscopy, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, **259**, 98.
44. Смолина Н. В., Сырейщикова Т. И., Узбеков М. Г., Добрецов Г. Е. (2015) Флуоресцентные зонды как источник клинически значимой информации. В кн. *Фундаментальные науки – медицине Биофизические медицинские технологии* (под ред. А. И. Григорьева и Ю.А. Владимирова), МАКС ПРЕСС, Москва, с. 293-327.
45. Babushkina, T. A., Klimova, T. P., Peregudov, A. S., Gryzunov, Yu. A., Smolina, N. V., Dobretsov, G. E., and Uzbekov, M. G. (2012) Study of high-resolution N1 nuclear magnetic resonance spectra of the serum and its albumin fraction in patients with the first schizophrenia episode, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **152**, 748-751, doi: 10.1007/s10517-012-1622-y.
46. Jocelyn, P. C. (1972) *Biochemistry of the SH Group*, London–New York, Academic Press.
47. Пиккеринг У. Ф. (1977) *Современная аналитическая химия*, Химия, Москва.
48. Gryzunov, Y. A., Aarroyo, A., and Vigne, J. L. (2003) Binding of fatty acids facilitates oxidation of cysteine-34 and converts copper-albumin complexes from antioxidants to prooxidants, *Arch. Biochem. Biophys.*, **413**, 53-66, doi: 10.1016/s0003-9861(03)00091-2.
49. Бриллиантова В. В., Смолина Н. В., Сырейщикова Т. И., Узбеков М. Г., Добрецов Г. Е. (2018) Состояние тиоловых групп альбумина у больных с первым эпизодом шизофрении, *Нейрохимия*, **35**, 96-100, doi: 10.7868/S102781331801003X.
50. Peters, T. J. (1995) *All about Albumin: Biochemistry, Genetics and Medical Applications*, San Diego, Academic Press.
51. Akahori, Y., Takumoto, N., Inoue, S., Nakatsukasa, H., Masuyama, H., and Hiramatsu, Y. (2010) Circulating levels of ciliary neurotrophic factor in normal pregnancy and preeclampsia, *Acta Med. Okayama*, **64**, 129-136, doi: 10.18926/АМО/32847.
52. Brondino, N., Rocchetti, M., and Fusar-Poli, L. (2018) Increased CNTF levels in adults with autism spectrum disorders, *World J. Biol. Psych.*, **19**, 742-746, doi: 10.1080/15622975.2018.1481999.
53. Uzbekov, M., and Shikhov, S. (2019) Ciliary neurotrophic factor disturbances in patients with melancholic depression, *Biomed. J. Sci. Tech. Res.*, **13**, 1-2, doi: 10.26717/BJSTR.2019.13.002408.
54. Najjar, S., Pearlman, D., Devinsky, O., Najjar, A., and Zagzag, D. (2013) Neurovascular unit dysfunction with blood-brain barrier hyperpermeability contributes to major depressive disorder: a review of clinical and experimental evidence, *J. Neuroinflamm.*, **10**, 142-158, doi: 10.1186/1742-2094-10-142.
55. Uzbekov, M. (2021) Monoamine oxidase as a potential biomarker of the efficacy of treatment of mental disorders, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 773-783, doi: 10.1134/S0006297921060146.
56. Мосолов С. Н., Узбеков М. Г., Сайкин М. А., Мисионжник Э. Ю., Цукарзи Э. Э., Молодецких А. В. (1999) Применение внутривенной низкоинтенсивной гелий-неоновой лазеротерапии и изменение ряда биохимических параметров у резистентных к психофармакотерапии больных шизофренией, *Соц. Клин. Психиатрия*, **9**, 57-62.
57. Chen, K., Wu, H. F., and Shih, J. C. (1993) The deduced amino acid sequences of human platelet and frontal cortex monoamine oxidase are identical, *J. Neurochem.*, **61**, 187-190, doi: 10.1111/j.1471-4159.1993.tb03554.x.
58. Herken, H., Gurel, A., Selek, S., Armutcu, F., Ozen, M. E., Bulut, M., Kap, O., Yumru, M., Savas, H. A., and Akyol, O. (2007) Adenosine deaminase, nitric oxide, superoxide dismutase and xanthine oxidase in patients with major depression: impact of antidepressant treatment, *Arch. Med. Res.*, **38**, 247-252, doi: 10.1016/j.arcmed.2006.10.005.
59. Martorell, M., Lucas, X., Alarcon-Zapata, P., Capó, X., Quetglas-Llabrés, M. M., Tejada, S., and Sureda, A. (2021) Targeting xanthine oxidase by natural products as a therapeutic approach for mental disorders, *Curr. Pharm. Des.*, **27**, 367-382, doi: 10.2174/138161282666600621165839.
60. Michel, T. M., Camara, S., and Tatschner, T. (2010) Increased xanthine oxidase in the thalamus and putamen in depression, *World J. Biol. Psychiatry*, **11**, 314-320, doi: 10.3109/15622970802123695.
61. Halliwell, B. (2014) *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*, Berlin, Springer.
62. Vavakova, M., Durackova, Z., and Trebaticka, J. (2015) Markers of oxidative stress and neuroprogression in depression disorder, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2015**, 898393, doi: 10.1155/2015/898393.
63. Strolin Benedetti, M., Whomsley, R., and Baltes, E. (2006) Involvement of enzymes other than CYPs in the oxidative metabolism of xenobiotics, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, **2**, 895-921, doi: 10.1517/17425255.2.6.895.

64. Callingham, B. A., Crosbie, A. E., and Rous, B. A. (1995) Some aspects of the pathophysiology of semicarbazide-sensitive amine oxidase enzymes, *Prog. Brain Res.*, **106**, 305-321, doi: 10.1016/s0079-6123(08)61227-3.
65. Toninello, A., Pietrangeli, P., De Marchi, U., Salvi, M., and Mondovi, B. (2006) Amine oxidases in apoptosis and cancer, *Biochim. Biophys. Acta*, **1765**, 1-13, doi: 10.1016/j.bbcan.2005.09.001.
66. Uzbekov, M., and Musina, L. (2018) Serum ciliary neurotrophic factor concentration as a potential biomarker of efficacy of citicoline pharmacotherapy of temporal-lobe epilepsy in women, *Theranost. Brain Spine Neural Disord.*, **3**, 555619, doi: 10.19080/JOJS.2019.03.555619.
67. Feher, J., Csomos, G., and Vereckei, A. (1985) *Free Radical Reactions in Medicine*, Heidelberg, Springer-Verlag, doi: 10.1007/978-3-642-83104-1.
68. Узбеков М. Г. (2014) Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психических заболеваниях. Сообщение I, *Соц. Клин. Психиатрия*, **4**, 97-103.

PATHOGENETIC MECHANISMS OF MENTAL DISORDERS: ENDOGENOUS INTOXICATION

Review

M. G. Uzbekov

Moscow Research Institute of Psychiatry – branch of V. Serbsky National Research Center of Psychiatry and Narcology of the Ministry of Health of the Russian Federation, 107258 Moscow, Russia; e-mail: uzbekovmg@gmail.com

There is described the existence of the syndrome of endogenous intoxication in patients with mental disorders. Oxidative stress, middle-mass endotoxic molecules, disorders in functional properties of the blood albumin and the thiols of the albumin, disturbances in the state of the neurotrophic factors and in the activity of several enzymes, including monoamine oxidase and semicarbazide-sensitive amine oxidase, contribute to the development of the endogenous intoxication. We introduce the scheme of the possible pathogenetic mechanisms of the development of the endogenous intoxication and the ways of its overcoming.

Keywords: endogenous intoxication, mental disorders, oxidative stress, middle-mass endotoxic molecules, albumin, enzymes, neurotrophic factors

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ОПОСРЕДУЮЩИЕ УЧАСТИЕ АСТРОЦИТОВ В СИНАПТОГЕНЕЗЕ И ПЛАСТИЧНОСТИ СИНАПСОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

Обзор

© 2023 Л.Г. Хаспекон*, Л.Е. Фрумкина

ФГБНУ «Научный центр неврологии»,
125367 Москва, Россия; электронная почта: khaspekleon@mail.ru

Поступила в редакцию 09.11.2022

После доработки 02.03.2023

Принята к публикации 03.03.2023

Астроциты выполняют широкий спектр важнейших функций в головном мозге. Являясь структурно и функционально интегрированными компонентами синапсов, астроциты секретируют факторы (белки, липиды, малые молекулы и др.), которые, связываясь с нейрональными рецепторами, способствуют синаптогенезу и регуляции синаптических контактов. Кроме того, астроцитарные факторы играют ключевую роль в формировании нейронных сетей, способных претерпевать синаптические (кратковременные и длительные) морфофункциональные пластические перестройки, играющие решающую роль при формировании памяти и поведения. В представленном обзоре обобщены данные литературы о молекулярных механизмах функционирования секретируемых астроцитами факторов, влияющих на процессы синаптогенеза в головном мозге. Приведены современные сведения о роли астроцитов в развитии долговременных пластических перестроек синаптических контактов и об участии в этих перестройках астроцитарных синаптогенных факторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: астроциты, синаптогенез, синаптическая пластичность.

DOI: 10.31857/S0320972523040061, **EDN:** AKQXKR

ВВЕДЕНИЕ

Астроциты являются наиболее распространенной разновидностью глиальных клеток, которые вступают в тесное морфофункциональное взаимодействие с телом, дендритами и шипиками нейрона и его синаптическими контактами, выполняя роль регуляторов развития ЦНС [1–3]. В коре головного мозга мышей тонкие перисинаптические отростки одного астроцита контактируют с более чем 100 000 синапсов [4]. Взаимодействие астроцитов с нейронами начинается в развивающихся структурах головного мозга, где интенсивный рост астроцитарных отростков происходит синхронно с активным синаптогенезом.

Астроциты играют в этом процессе ключевую роль, контролируя формирование синаптических ансамблей и созревание синапсов [5–7]. За два последних десятилетия результаты многочисленных исследований молекулярных механизмов формирования синапсов [8] представили доказательства существования целого ряда секретируемых астроцитами факторов, способствующих синаптогенезу, таких как белки, липиды и малые молекулы, которые контролируют различные аспекты формирования и созревания возбуждающих и тормозных синапсов. «Синаптогенные профили» астроцитов в разных структурах головного мозга могут отличаться друг от друга [6], однако данный вопрос требует специального обсуждения.

Принятые сокращения: ГКС – ганглиозные клетки сетчатки; ГЛК – глипиканы; ПОА – перисинаптические отростки астроцитов; ТСП – тромбоспондины; AMPA-R – постсинаптические AMPA-рецепторы; BDNF – нейротрофический фактор головного мозга; Chrdl1 – белок хординовый 1; Nevin – высокоуровневый белок эндотелия венул; LTD – долговременная депрессия; LTP – долговременная потенция; PTX3 – пентраксин-3; γ -Pcdh – γ -протокадхерин; Shh – сигнальный каскад Sonic Hedgehog; SPARC – секретируемый кислый белок, обогащенный цистеином; SREBP – белок, связывающий регуляторный элемент стерола; TGF- β – трансформирующий фактор роста β .

* Адресат для корреспонденции.

В ткани зрелого мозга тесное морфо-функциональное взаимодействие астроцита с пре- и постсинаптическими структурами осуществляется в составе «трехкомпонентного синапса» (“tripartite synapse”). В него, помимо указанных синаптических структур, входят перисинаптические отростки астроцитов (ПОА), которые выступают в роли модуляторов синаптической передачи, секретируя глутрансмиттеры и устраняя избыток нейромедиатора из активной зоны синапса [9, 10]. В модуляции нейротрансмиссии (синаптической пластичности), сопровождающейся модификацией структуры синапса в ответ на внешние стимулы, активное участие принимают синаптогенные факторы астроцитов.

АСТРОЦИТЫ И СИНАПТОГЕНЕЗ

Впервые участие астроцитов в синаптогенезе было обнаружено в экспериментах на культивируемых ганглиозных клетках сетчатки (ГКС) мыши, показавших, что добавление астроцитов к культурам стимулирует формирование синапсов и усиливает спонтанную биоэлектрическую активность нейронов [11–13]. Позднее было показано, что астроциты ускоряют нейрональную морфофункциональную дифференцировку эмбриональных стволовых клеток человека [14].

После обнаружения синаптогенных свойств астроцитов оказалось, что эти свойства реализуются как адгезивным путем, в результате тесного контакта ПОА в трехкомпонентном синапсе [15–17], так и под воздействием высвобождаемых ими растворимых факторов, индуцирующих формирование синапсов [18, 19] (рис. 1, таблица). Среди этих факторов в первую очередь следует назвать тромбоспондины, высокоуровневый белок эндотелия венул Hevin (high endothelial venule protein), обозначаемый также как SPARCL1 (secreted protein acidic and rich in cysteine-like 1, SPARC-подобный белок 1), SPARC (secreted protein acidic rich in cysteine, секретируемый кислый белок, обогащенный цистеином), глипиканы (ГЛК) 4 и 6, BDNF (brain derived neurotrophic factor, нейротрофический фактор головного мозга), TGF- β (transforming growth factor β , трансформирующий фактор роста β) и γ -протокадхерины [20].

Тромбоспондины (ТСП) представляют собой семейство крупных олигомерных мультимодалых растворимых гликопротеинов внеклеточного матрикса, которые модулируют контакты клетка–клетка или клетка–матрикс, связываясь с мембранными рецепторами или

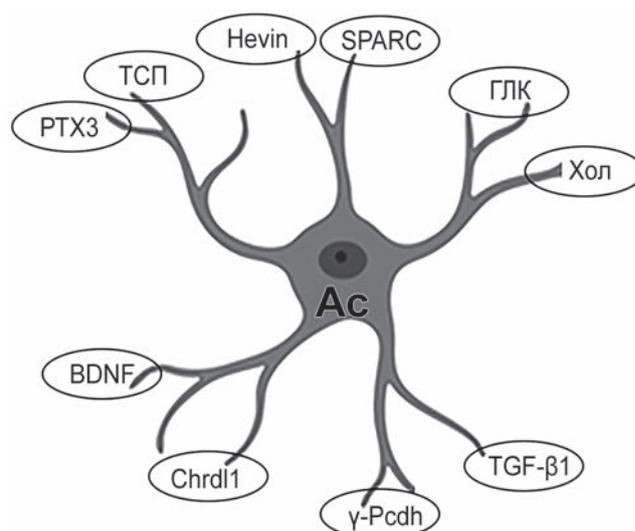


Рис. 1. Основные факторы, секретируемые астроцитами и оказывающие синаптогенный эффект. Ас – астроцит; ТСП – тромбоспондины; ГЛК – глипиканы; Хол – холестерин; TGF- β 1 – трансформирующий фактор роста β 1; γ -Pcdh – γ -протокадхерины; Chrd11 – хординовый 1; BDNF – нейротрофический фактор головного мозга; PTX3 – пентраксин-3

белками матрикса и цитокинами [21]. У млекопитающих обнаружено 5 типов ТСП, три из которых (1, 2 и 4) экспрессируются в ЦНС. Было показано, что в глионейрональной культуре ГКС крысы основными синаптогенными компонентами питательной среды, кондиционированной астроцитами, являются белки семейства ТСП, секреция которых на ранних стадиях развития астроцитов регулируется пуринергической сигнализацией, опосредуемой P2Y-рецепторами [22, 23]. При этом необходимым условием формирования глутаматергических синапсов *in vitro* оказалось присутствие в питательной среде ТСП1, однако они оставались функционально неактивными, что указывало на отсутствие постсинаптических AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)-рецепторов (AMPA-R). Авторы также обнаружили, что очищенные ТСП1 и ТСП2 воспроизводят *in vitro* синаптогенный эффект, оказываемый кондиционированной средой, а у мышей, не экспрессирующих ТСП1/2, плотность возбуждающих синапсов в коре головного мозга значительно снижается. Исследование рецепторного механизма синаптогенного эффекта ТСП с использованием анализа доменной структуры белков показало, что вероятным нейрональным рецептором к ТСП является вспомогательная субъединица α 2 δ -1 (Calcium Voltage-Gated Channel Auxiliary Subunit Alpha2delta 1, или Casca2d-1) потенциал-зависимого кальциевого канала, известная как рецептор к антиэпилептическому средству

Влияние факторов, секретируемых астроцитами, на синаптогенез и пластичность синапсов

Наименование фактора	Оказываемый эффект	Ссылка
Тромбоспондины 1 и 2	* формирование лишенных AMPA-R молчащих синапсов, опосредуемое рецептором $\alpha 2\delta$ -1	[22, 24, 26]
Hevin	формирование глутаматергических синапсов; возможное участие в сопряжении пресинаптических нейрексинов 1 α с постсинаптическими нейролигинами 1B;	[29, 30, 32]
	оптимизация локализации развивающихся синапсов	[68]
SPARC	торможение формирования глутаматергических синапсов с дестабилизацией постсинаптических AMPA-R	[29, 30, 31]
Глипиканы 4 и 6	обогащение синапсов кластерами GluR1-субъединиц AMPA-R	[35, 36]
BDNF	* стимуляция роста дендритов, повышение плотности дендритных шипиков, образующих возбуждающие синаптические контакты	[18, 40]
TGF- β 1	развитие синапсов путем индукции высвобождения агониста постсинаптического NMDA-R D-серина, с участием активированной CaMKII и с кластеризацией нейролигина 2 в ГАМКергических синапсах;	[41–43]
	* усиление синаптогенеза при активации сигнального каскада TGF- β фибулином-2, транспортируемым малыми астроцитарными экстраклеточными везикулами	[44]
Хординовый 1	формирование зрелых синапсов, содержащих непроницаемые для Ca^{2+} GluA2 AMPA-R;	[45]
	торможение пластических процессов путем замещения проницаемых для Ca^{2+} AMPA-R, на GluA2 AMPA-R, не проницаемые для Ca^{2+}	[73]
γ -Протокадхерин	* контактно-адгезивное формирование синапсов <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>	[46, 47]
Холестерин	ускорение пресинаптической дифференцировки, стабилизация высвобождения нейромедиатора и синаптической передачи;	[50–52]
	* ускорение формирования и модификации шипиков	[53, 54]
Пентраксин-3	* повышение уровня и усиление синаптической кластеризации AMPA-R с участием белка TSG 6 и сигнального пути β 1-integrin/ERK	[20, 58]
Эфрины	* регуляция процессов морфогенеза, формирования, пластичности возбуждающих и тормозных синапсов и контроль баланса между ними; созревание дендритных шипиков	[61–63]
Белок Sp1	* регуляция экспрессии Toll-подобного рецептора 2 и Cfb, активирующих рост нейритов и синаптогенез	[64]
Белок Nogo-A	* снижение экспрессии мРНК генов, опосредующих синаптогенез, таких как Hevin, глипикан 4, TGF- β 1 и BDNF; повышение уровня SPARC	[65]
Каскад Sonic Hedgehog (Shh)	экспрессия генов, регулирующих синаптогенез, опосредуемая стимуляцией рецептора Shh, PTCH1; * активация синаптогенеза экспрессией Shh-зависимых генов <i>Lrig1</i> и <i>Sparc</i>	[66]

Таблица (продолжение)

Наименование фактора	Оказываемый эффект	Ссылка
PGC-1 α	* промотирование синаптогенеза усилением морфогенеза митохондрий в астроцитах в процессе их развития при участии PGC-1 α , коактиватора рецептора PPAR γ	[67]
D-серин	усиление LTP, опосредуемой NMDA-R; потенциация ответов нейронов поля CA1 гиппокампа; * усиление NMDA-R-зависимой генерации ВПСП и индукции LTP, опосредуемое активацией H1-гистаминовых рецепторов в поле CA1	[79–81]
Глутамат	экспрессия LTD в синапсах полей CA1–CA3 гиппокампа, зависимая от SNARE- и Ca ²⁺ -опосредуемой везикулярной секреции глутамата	[86]
АТФ/Аденозин	индукция LTP и переключение LTD на LTP; * развитие LTD, опосредуемое A1R, при активации рецептора DREADD; индукция LTD/LTP при активации CB1R	[83, 84, 87, 88]
Хемокины и цитокины	индукция LTP при усилении экспрессии гена IL-6; * облегчение ГАМК-трансмиссии в амигдале и гиппокампе при гиперэкспрессии IL-6	[94, 95]
Лактат	торможение LTP при ингибировании астроцитарных монокарбоксилатных экспортных транспортеров лактата (MCT1 и MCT4) или его нейронального импортного транспортера (MCT2); * облегчение нарушений памяти, вызванных блокадой астроглиального гликогенолиза	[97, 98]

Примечание. * Новые данные, полученные за последние 2–3 года, об астроцитарных факторах, оказывающих синаптогенный эффект и влияющих на пластичность синапсов.

Список используемых сокращений: ВПСП – возбуждающий постсинаптический потенциал; Ас – астроцит; Hevin – высокоуровневый белок эндотелия венул; SPARC – секретируемый кислый белок, обогащенный цистеином; TGF- β 1 – трансформирующий фактор роста.

и анальгетику габапентину, который *in vivo* и *in vitro* препятствовал формированию возбуждающих синапсов под воздействием ТСП [24, 25]. Нокаут генов, кодирующих α 2 δ -1, привел к значительному дефициту возбуждающих синапсов и нарушению их ультраструктуры, а также тормозил формирование шипиков в коре головного мозга мыши, при этом необходимым и достаточным условием для синаптогенеза *in vitro* и спиногенеза *in vivo* было наличие постсинаптического α 2 δ -1 [26]. В этой же работе обнаружилось, что важным звеном, постсинаптически контролирующим синаптогенез в сигнальном каскаде, опосредуемом взаимодействием ТСП с α 2 δ -1, является RhoGTP-аза Rac 1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1). Также было показано, что ТСП1 в культуре клеток гиппокампа крысы, взаимодействуя с постсинаптическим нейрוליгином 1 (NL1), стимулирует формирование возбуждающих синапсов, а нокаут гена, кодирующего NL1, препятствует эффекту ТСП1 [27]. С другой стороны, белки семейства нейрוליгинов NL1,

NL2 и NL3, экспрессируемые кортикальными астроцитами, контролируют их морфогенез, взаимодействуя с нейрональными нейреликсами. При этом нокаут гена, кодирующего астроцитарный NL2, приводит к снижению формирования и функционирования корковых возбуждающих синапсов, тогда как тормозная синаптическая функция возрастает, что указывает на взаимосвязь морфогенеза астроцитов с синаптогенезом [28].

Hevin и SPARC – два других фактора, продуцируемых астроцитами, оказывают противоположное действие на формирование глутаматергических возбуждающих синапсов [29, 30]. Так, в культуре ГКС мыши Hevin индуцировал формирование синапсов между ними, а SPARC препятствовал этому эффекту, ингибируя постсинаптические β 3-интегрины и дестабилизируя при этом АМРА-R постсинаптической мембраны [31]. Оба фактора экспрессируются в верхнем двухолмии мышей, содержащем афференты от ГКС. У животных, не экспрессирующих Hevin, количество

возбуждающих синапсов здесь было сниженным по сравнению с животными, не экспрессирующими SPARC, у которых синаптогенез в этой области мозга к 14 дню постнатального развития усиливался. Эти же авторы показали, что присутствие Nevin необходимо для структурной дифференцировки ретиноколликкулярных синапсов, а также то, что поскольку SPARC не ингибирует синаптогенез, индуцированный астроцитарными ТСП, он может быть специфическим антагонистом Nevin. Таким образом, взаимодействие позитивных (Nevin) и негативных (SPARC) астроцитарных факторов синаптогенеза может контролировать морфофункциональное развитие и пластичность синапсов.

Показана роль Nevin в сборке глутаматергических синапсов *in vitro* и таламокортикальных синапсов *in vivo*. Обнаружено, что этот синаптогенный белок сопрягает между собой изоформу пресинаптических нейрексина (нейрексин 1 α) с изоформой постсинаптических нейролигинов (нейролигин 1В), которые напрямую не взаимодействуют друг с другом. Предполагается, что это сопряжение имеет решающее значение для формирования и пластичности таламокортикальных глутаматергических связей в развивающейся зрительной коре [32]. Однако данное предположение остается дискуссионным, поскольку в недавней работе на глионейрональных культурах новорожденных мышей было показано, что Nevin избирательно усиливает формирование возбуждающих синапсов и синаптическую трансмиссию, используя не зависимый от нейрексина и нейролигинов механизм [33].

ТСП-1/2 и Nevin вносят вклад в формирование «молчащих» синапсов, лишенных AMPA-R [20]. Однако кондиционированная астроцитами питательная среда способствует формированию между ГКС полноценных функциональных синапсов, что указывает на существование молекул, опосредующих синаптический трафик и кластеризацию AMPA-R.

Глипиканы. Тщательный анализ состава питательной среды с использованием двумерного электрофореза и аффинной хроматографии обнаружил, что глипиканы (ГЛК) 4 и 6 инициируют обогащение синапсов GluA1-субъединицами AMPA-R, рекрутируя их, в отличие от других субъединиц AMPA-R, к синаптической мембране с формированием кластеров [34, 35]. Также было показано, что *in vivo* нокаутирование *GPC4* (гена, кодирующего ГЛК4) значительно снижает в поле CA1 гиппокампа количество зрелых синапсов, содержащих GluA1. В дальнейшем был обнаружен

еще один сигнальный каскад, опосредующий ГЛК4-усиление экспрессии нейронального пентраксина 1 (NPTX1) – фактора кластеризации AMPA-R в синапсах [36]. Результаты этой работы показали, что ГЛК4 индуцирует пресинаптическое высвобождение NPTX1, опосредуемое 2 α -типом рецептора протеин тирозинфосфатазы (RPTP δ), взаимодействие которой с GluA1 усиливает рекрутирование AMPA-R к постсинаптической мембране, способствуя созреванию функциональных синапсов. В регуляции синаптогенеза могут также участвовать обогащенные лейцином постсинаптические трансмембранные белки LRRTMs (leucine-rich repeat transmembrane proteins) [37], которые, подобно RPTP δ , связываются с ГЛК4, а также взаимодействуют с пресинаптическими нейрексинами и PTP σ (receptor type protein tyrosine phosphatase σ), индуцируя дифференцировку пресинапса [38].

BDNF. Выраженные синаптогенные свойства обнаружены у BDNF, секретируемого астроцитами [39]. BDNF, вырабатываемый и высвобождаемый нейронами, накапливается в астроцитах, которые затем секретируют его путем экзоцитоза, опосредуемого белком секреторных везикул семейства VAMP2 (vesicle-associated membrane protein 2) синаптобревином, компонентом белкового комплекса SNARE, вызывая повышение плотности дендритных шипиков и стимулируя рост дендритов [18, 40].

TGF- β 1. В развитии возбуждающих (глутаматергических) и тормозных (ГАМКергических) синапсов участвует секретируемый астроцитами цитокин TGF- β 1, который, связываясь с синаптическими или астроцитарными рецепторами к TGF- β 1, индуцирует высвобождение коагониста NMDA-рецептора D-серина, причем показано, что генетическое и фармакологическое ингибирование последнего препятствует синаптогенному эффекту TGF- β 1 [41–43]. Далее, с участием глутамата происходит формирование и созревание синапса, опосредуемое постсинаптическим рецептором к NMDA. Авторы обнаружили, что развитие тормозных синапсов под влиянием TGF- β 1 происходит при участии активированной постсинаптической CaMKII (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II), указывая на взаимодействие глутамата и D-серина с постсинаптическим NMDA-рецептором, сопровождающееся кластеризацией нейролигина 2 в ГАМКергических синапсах. Кроме того, эти авторы показали, что для синапсов, сформированных при участии TGF- β , характерны нормальная ультраструктура и полноценные функциональные свойства [41, 42].

В одной из недавних работ на нейрональных культурах клеток коры эмбрионов крысы [44] было обнаружено усиление синаптогенеза при активации сигнального каскада TGF- β фибулином-2 (Ca²⁺-связывающим гликопротеином внеклеточного матрикса), который транспортировался малыми экстраклеточными везикулами, секретлируемыми астроцитами. Обработка нейронов фибулином-2 или астроцитарными везикулами усиливала фосфорилирование Smad2, модулятора сигнального каскада TGF- β , и активировала синаптогенез и формирование дендритных шипиков. С другой стороны, ингибирование каскада TGF- β препятствовало синаптогенным эффектам фибулина-2 и везикул.

Хординовый 1. Полагают, что еще один фактор, интенсивно секретлируемый кортикальными астроцитами мыши во время синаптогенеза, белок хординовый 1 (Chordin-like 1, Chrdl1), необходим для формирования зрелых синапсов, содержащих непроницаемые для Ca²⁺ GluA2 AMPA-R, которые замещают Ca²⁺-проницаемые AMPA-R [45]. Нокаутирование *Chrdl1* вызывает редукцию синаптических GluA2 AMPA-R и нарушает динамику замещения ими AMPA-R, проницаемых для Ca²⁺.

γ -Протокадхерин. Опубликованы данные о синаптогенных свойствах γ -протокадхерина (γ -Pcdh) [46] из семейства молекул нейрональной адгезии, широко распространенного в клетках ЦНС, в том числе в ПОА [47]. В экспериментах использовали нейронально-астроцитарные культуры мышинового спинного мозга с нокаутированным геном, кодирующим γ -Pcdh, либо в астроцитах, либо в нейронах. В культурах с нокаутом астроцитарного γ -Pcdh-кластера происходила значительная задержка формирования как возбуждающих, так и тормозных синапсов. Аналогичные результаты были получены авторами в экспериментах *in vivo* в исследовании спинного мозга эмбрионов мышей с нокаутированным геном астроцитарного γ -Pcdh. Полученные результаты подтверждают существование контактного механизма синаптогенеза, опосредуемого γ -Pcdh в ПОА. Следует, однако, отметить, что недавно была обнаружена способность γ -Pcdh контактировать с нейрוליгином 1 и препятствовать его связыванию с нейрорексином 1, вызывая ингибирование синаптогенеза [48] и указывая на различную временную роль γ -Pcdh в дифференцировке различных типов нейронов.

Холестерин. В ряде опубликованных ранее результатов экспериментальных исследований [49, 50] и обзорных работах [51–53] значительная роль в реализации процессов

синаптогенеза в ЦНС отводится холестерину. В частности, сообщается, что глиальный (в том числе астроцитарный) холестерин способствует развитию синапсов в нейрональных микрокультурах ГКС постнатальных крыс, ускоряет пресинаптическую дифференцировку и необходим для непрерывного синаптогенеза и стабилизации высвобождения нейромедиатора. При этом степень промотирующего воздействия на синаптогенез напрямую зависит от уровня астроцитарных липопротеинов и, прежде всего, аполипипотеина E (ApoE), осуществляющего межклеточную транспортировку липидов, а истощение запасов холестерина в астроцитах нарушает синаптическую передачу. Полученные результаты расширяют представления об участии холестерина в дифференцировке нейронов и подчеркивают важную роль взаимодействия нейронов и глиальных липидов в процессах синаптогенеза.

Об этом свидетельствуют также данные о значении продуктов липидного метаболизма в астроцитах для формирования и функционирования синапсов в гиппокампе мыши [54, 55], показавшие, что синтез холестерина и жирных кислот в астроцитах происходит с участием содержащегося в них (но не в нейронах) белка, связывающего регуляторный элемент стерола (sterol regulatory element binding protein, SREBP), расщепление которого активируется белком SCAP (SREBP cleavage-activating protein). В этих же работах было обнаружено, что нокаутирование *SCAP* в глиальных клетках, экспрессирующих GFAP, снижает секрецию холестерина и фосфолипидов астроцитами и задерживает созревание синапсов, а также уменьшает уровень пресинаптического мембранного белка SNAP-25 (synaptosomal-associated protein, 25 кДа) семейства SNARE (soluble NSF attachment receptor), опосредующего экзоцитоз синаптических везикул и количество этих везикул в пресинаптических терминалях. Нокаутирование гена еще одного астроцитарного регулятора уровня холестерина в мозге, SREBP2, снижало количество синапсов *in vitro* и вызывало моторный дефицит у мышей [55]. Редукцию числа возбуждающих синапсов в медиальной префронтальной коре мыши и нарушение их функциональных показателей *in vitro* вызывало нокаутирование в астроцитах гена, кодирующего FABP7 (fatty acid binding protein 7) [56].

Пентраксин-3. Значительным синаптогенным эффектом обладает экспрессируемый астроцитами пренатального мозга пентраксин-3 (PTX3) из суперсемейства многофункциональных консервативных белков, представляющих

собой класс рецепторов распознавания образов (PRR) [4, 57]. РТХ3 стимулирует формирование функционально активных синапсов ЦНС, повышая уровни и синаптическую кластеризацию АМРА-*R* глутамата. В этот процесс, сопровождающийся ремоделированием периневрональной сети, включается белок TSG 6 (tumor necrosis factor-induced protein 6) и сигнальный путь β 1-integrin/ERK (β 1-integrin/extracellular signal regulated kinase 1). Кроме того, активность РТХ3 регулируется ТСП1, который непосредственно взаимодействует с *N*-концевой областью РТХ3. Это взаимодействие блокирует свойство РТХ3 способствовать кластеризации синаптических АМРА-рецепторов [20, 58]. Таким образом, полученные данные раскрывают фундаментальную роль РТХ3 в продвижении первой волны синаптогенеза и показывают, что во взаимодействии ТСП1 и РТХ3 в развивающемся мозге между формированием и функцией синапсов, а также между тормозным и возбуждающим синаптогенезом устанавливается оптимальный пространственно-временной контролируемый баланс.

Эфрины. Заметную роль в синаптогенезе играют секретируемые астроцитами трансмембранные белки эфрины, взаимодействующие с рецепторами Eph1 и Eph2 в двунаправленной сигнализации между астроцитами и нейронами и идентифицируемые в перисинаптических отростках астроцитов [59, 60]. В частности, астроцитарный эфрин-В1 влияет на морфогенез, формирование и пластичность синапсов, контролирует баланс между возбуждением и торможением в гиппокампе, а нокаутирование кодирующего его гена в астроцитах мышей повышает плотность незрелых дендритных шипиков [61–63].

Астроцитарный белок Sp1. Экспрессию генов, опосредующих рост нейритов и синаптогенез, модулирует астроцитарный белок Sp1 (specificity protein 1) из семейства транскрипционных факторов Sp/KLF (specificity protein/krüppel-like factor) [64]. По данным авторов, нокаутирование гена, кодирующего Sp1 в астроцитах, уменьшает количество нейронов в коре головного мозга и гиппокампе, а питательная среда, кондиционированная нокаутными астроцитами, тормозит рост дендритов и формирование синапсов. Кроме того, в астроцитах снижается экспрессия Toll-подобного рецептора 2 и Cfb (комплементарного фактора b, активатора С3-конвертазы), что также отрицательно влияет на рост нейритов и синаптогенез с последующим нарушением функции нейронов.

Nogo-A. Заслуживает внимания недавнее исследование влияния астроцитарного белка Nogo-A, ассоциированного с миелином ингибитора роста нейритов, на синаптогенез, индуцируемый факторами, секретируемыми астроцитами [65]. Оказалось, что обработка Nogo-A культур астроцитов новорожденных мышей снижает в клетках экспрессию мРНК генов у факторов, опосредующих синаптогенез, таких как Nevin, глипикан 4, TGF- β 1 и BDNF, а также снижает уровень Nevin и повышает уровень SPARC. Кроме того, кондиционированная среда от культур астроцитов, обработанных Nogo-A, подавляла формирование структурно и функционально зрелых синапсов в культурах кортикальных нейронов. Таким образом, взаимодействие между Nogo-A и астроцитами может быть существенным путем регуляции синаптогенеза.

Сигнальный каскад Sonic Hedgehog. Показана роль взаимодействия сигнального каскада Sonic Hedgehog (Shh) с астроцитами в развитии корковых синапсов [66]. Обнаружено, что стимуляция рецептора Shh, РТСН1 (Protein patched homolog 1), формирующегося на корковых астроцитах, вызывает экспрессию генов, опосредующих регуляцию синаптогенеза, а утрата Shh в нейронах упрощает структуру астроцитов и уменьшает их синаптогенную роль в составе трехкомпонентного синапса. С другой стороны, активация пути Shh, а также Shh-зависимые гены *Lrig1* и *Sparc* способствуют усложнению структуры астроцитов и синаптогенезу. Эти результаты позволяют предположить, что нейрональный Shh участвует в регуляции синаптогенных свойств астроцитов, влияющих на морфофункциональное развитие нейронных цепей.

Биогенез митохондрий. В одной из недавних работ обнаружено, что в астроцитарном морфогенезе и синаптогенезе важная роль принадлежит биогенезу митохондрий, опосредуемому транзитной активацией метаболического регулятора, которым является коактиватор PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 α) рецептора PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), контролируемый mGluR5 [67]. Авторы показали, что нокаутирование или ингибирование астроцитарного PGC-1 α подавляет морфогенез астроцитов и тормозит формирование и функционирование соседних синапсов, тогда как его генетическая реэкспрессия восстанавливает компартмент митохондрий и корректирует астроглиальные и синаптические нарушения. Таким образом, усиление биогенеза митохондрий в астроцитах в процессе

развития является еще одним фактором, контролирующим созревание астроцитов и поддерживающим синаптогенез.

АСТРОЦИТЫ И ПЛАСТИЧНОСТЬ

Общеизвестно, что способность синапсов модифицировать свою структуру в ответ на внешние стимулы (синаптическая пластичность) существует на протяжении всего постнатального периода и позволяет непрерывно ремоделировать нейронные сети по мере накопления жизненного опыта. Например, дендритные шипики претерпевают дифференцировку во время усиленной нейронной активности, но элиминируются при ее ослаблении [68]. Транзиентное подавление метаболизма астроцитов фторацетатом предотвращает ремоделирование нейрональных сетей, в то время как длительная стимуляция метаболических глутаматных рецепторов, сопряженных с G_i -белком, потенцирует пластические процессы в коре [69]. Астроциты модулируют синаптическую пластичность, контролируя ионный гомеостаз, устраняя нейромедиаторы из синаптической щели, возвращая их в пресинаптические компартменты и секретируя глиотрансмиттеры (D-серин, глутамат, АТР) [70]. Эта модуляция происходит во многом благодаря существованию тесных контактов ПОА с синаптическим контактом в пределах трехкомпонентного синапса (пресинапс, постсинапс, астроцит) и присутствию в них молекулярных медиаторов, к которым относят рецепторы $mGluR$, переносчики глутамата и ионные каналы [16, 71]. Наличие тесной взаимосвязи ПОА с синапсом, опосредуемой молекулами клеточной адгезии, подтверждается их присутствием в изолированных препаратах синапсом, содержащих пресинаптические и постсинаптические компартменты (синаптоглиосомах) [72].

Помимо того, что динамические взаимодействия между нейронами и астроцитами в развивающейся нервной системе сопровождаются формированием синапсов, эти взаимодействия сохраняют свое функциональное значение и в зрелом мозге, в котором ряд факторов синаптогенеза, экспрессируемых астроцитами, опосредуют также и пластические перестройки синаптических межнейронных связей (рис. 2, таблица).

Так, экспрессия *Nevin* остается высокой на протяжении всего раннего критического периода развития, что, как показано на примере таламокортикальных связей, способству-

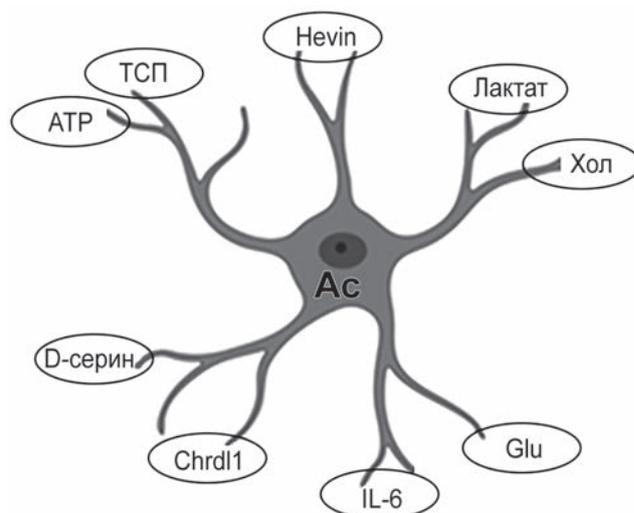


Рис. 2. Основные факторы, секретируемые астроцитами и модулирующие синаптическую пластичность. Glu – глутамат; IL-6 – интерлейкин-6. Остальные аббревиатуры те же, что и на рис. 1

ет оптимальной локализации развивающихся синапсов. При этом нокаутирование гена, кодирующего *Nevin*, вызывает увеличение числа незрелых шипиков и нарушает локализацию возбуждающих синапсов, что делает возможным формирование артефактных связей, вероятно, вследствие дефекта синаптической дифференцировки [68]. Связующая роль *Nevin* между нейрексином 1 α и нейролигином 1B, рекрутирующая к синапсам NMDA-рецепторы, у *Nevin*-нокаутов утрачивается, что нарушает окулярную доминантную пластичность, для которой характерна способность синапсов зрительной коры к ремоделированию в ответ на изменения зрительного опыта. При возобновлении экспрессии *Nevin* в астроцитах зрительной коры окулярное доминирование восстанавливается, указывая на то, что наличие экспрессии этого фактора в астроцитах достаточно для контроля данной формы пластичности [32]. Количество трансмембранных синаптических AMPA-R регулируется астроцитарным фактором SPARC. Нокаутирование гена, кодирующего SPARC, вызывает чрезмерное накопление AMPA-R и облегчает возбуждающую глутаматергическую передачу, нарушая оптимальное синаптическое соотношение AMPA-R и NMDA-R [31].

Секретируемый астроцитами белок хординовый 1 участвует в торможении пластических процессов в зрительной коре мыши, опосредуя замещение проницаемых для Ca^{2+} AMPA-R на GluA2 AMPA-R, не проницаемые для Ca^{2+} . При нокаутировании *Chrdl1*, препятствующем этому замещению, односторонняя энуклеация приводит к интенсификации пластических

процессов в зрительной коре, не прекращающихся в зрелом возрасте, и ремоделированию в ней бинокулярной зоны [73].

Роль астроцитарного холестерина также не ограничивается его синаптогенными свойствами, но имеет и фундаментальное значение для синаптической пластичности [74]. Содержание белков *SREBP*, регулирующих уровень холестерина, достигает в астроцитах заметных значений. Нокаутирование *SREBP* снижает интенсивность синтеза холестерина в гиппокампе, замедляет формирование и модификацию шипиков [54].

Одним из проявлений пластических перестроек синаптического сигнала, лежащих, как полагают, в основе памяти, является долговременное изменение его эффективности (силы), которая, в зависимости от уровня синаптической активности, может либо потенцироваться (long term potentiation, LTP), либо ингибироваться (long term depression, LTD). Результаты работ последнего десятилетия свидетельствуют об активном участии факторов, секретируемых астроцитами, в регуляции этих форм пластичности синапсов в зрелом мозге [75–77].

Как уже было отмечено выше, регуляция LTP тесно связана с секрецией астроцитами глиотрансмиттеров и, в первую очередь D-серина, глутамата и АТФ/аденозина [78]. Так, в срезах гиппокампа взрослых мышей астроцитарный D-серин усиливал LTP, опосредуемую NMDA-R [79]. В гиппокампе мышей активация астроцитов через сопряженный с G_i -белком «дизайнерский» рецептор DREADD (designer receptor exclusively activated by designer drug) индуцировала опосредуемую D-серином, секретируемым астроцитами, потенциацию ответов нейронов поля CA1 на стимуляцию коллатералей Шаффера [80]. Опосредуемая D-серином, секретируемым длительно возбуждаемыми астроцитами, активация H1-гистаминовых рецепторов в поле CA1 гиппокампа приводила к усиленной NMDA-R-зависимой генерации возбуждающего постсинаптического потенциала (ВПСП) и индукции LTP [81].

При индукции LTD, опосредуемой активацией аденозиновых A1R кортикостриатных синапсов в дорзолатеральном стриатуме (ДС), кортикальная высокочастотная стимуляция вызывала повышение уровня Ca^{2+} в астроцитах стриатума, активируя метаболитные глутаматные рецепторы типа 5 (mGluR5), что было необходимо для формирования LTD [82]. С другой стороны, секреция астроцитами глутамата и аденозина предполагается как одно из основных условий индукции LTP и переключения LTD на LTP [83]. Кроме того, активация

астроцитов через рецептор DREADD способствовала развитию LTD, опосредованному A1R в кортикостриатных синапсах. Глутамат, секретируемый астроцитами при активации в срезах гиппокампа и в культуре астроцитов крысы PAR1 (protease activated receptor 1), сопровождавшейся повышением концентрации внутриклеточного кальция, взаимодействует с нейрональными NMDA-R и тем самым усиливает опосредуемые ими токи [84], а также стимулирует LTP, вызванную тета-ритмической стимуляцией [85].

Выявлено, что необходимым условием экспрессии LTD в синапсах полей CA1–CA3 гиппокампа является зависимость от SNARE и Ca^{2+} везикулярная секреция глутамата астроцитами [86]. В этой же работе показано, что низкочастотная активация астроцитов, даже в отсутствие пресинаптического возбуждения, индуцирует утрату постсинаптических AMPA-R и экспрессию LTD, и что условием гиперсекреции астроцитарного глутамата и взаимодействия астроцитов с нейронами при низкочастотной активации является реализация сигнального каскада p38α MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), поскольку при отсутствии астроцитарного p38α экспрессии LTD не происходит.

Секретируемые астроцитами АТФ/аденозин участвуют во многих формах долговременной пластичности в различных областях мозга. В гипоталамусе крыс астроцитарный АТФ, секретируемый под влиянием холецистокинина, может переключать пластические перестройки ГАМКергических синапсов с LTD на LTP, воздействуя на пуриновые пресинаптические P2X-рецепторы и усиливая пресинаптическую активацию, с продлением высвобождения ГАМК [87, 88]. При активации астроцитов центральной амигдалы мышей, опосредуемой каннабиноидными рецепторами 1-го типа (CB1R) [89], секретируемые АТФ/аденозин могут вызвать как LTD, так и LTP. Такая вероятность обусловлена тем, что аденозин, с одной стороны, тормозит через рецепторы A1, возбуждающие синапсы афферентов базолатеральной миндалины, а с другой – через рецепторы A2 усиливает тормозные синапсы афферентов латеральной центральной миндалины, что определяется, соответственно, уменьшением или увеличением вероятности высвобождения аденозина. В целом, такая активация астроцитов снижала скорость реакции нейронов центрального миндалевидного тела, вызывая торможение реакции страха у мышей [90]. Наряду с этим, предполагается возможность контроля LTP в гиппокампе при взаимодей-

ствии СВ1R с астроцитарным D-серином [91]. Кроме того, допускается участие СВ1R, в том числе экспрессируемых астроцитами, в регуляции баланса между возбуждением и торможением в коре головного мозга [92].

В реализации когнитивных процессов участвуют секретируемые астроцитами хемокины и цитокины. В частности, усиленная экспрессия гена интерлейкина-6 (*IL-6*) сопровождается индукцией LTP, свидетельствуя о его вовлечении в синаптическую пластичность [93]. Нокаутирование генов астроцитарного *IL-6* и *IL-6*-рецептора приводит к усилению тревожности и дефициту исследовательского поведения у мышей [94]. У трансгенных мышей с гиперэкспрессией *IL-6* облегчалась ГАМК-трансмиссия в амигдале и гиппокампе, что сопровождалось эмоциональными нарушениями (тревожностью и депрессивным поведением) [95].

В пластических процессах в ЦНС важную роль играет секретируемый астроцитами продукт анаэробного гликолиза — лактат [96]. Ингибирование экспрессии астроцитарных монокарбоксилатных транспортеров МСТ1 и МСТ4, которые экспортируют лактат из клеток, вызывало нарушение LTP и амнезию, которые устранялись L-лактатом, в то время как ингибирование экспрессии их нейронального гомолога МСТ2 (импортера лактата) приводило к амнезии, на которую L-лактат не влиял [97]. Блокада астроглиального гликогенолиза сопровождалась нарушениями памяти, облегчаемыми лактатом и субстратами цикла Кребса [98], а торможение продукции астроглиального гликогена у мышей нокаутированием гена гликогенсинтазы значительно затрудняло процесс формирования LTP [99]. Снижение продукции лактата астроцитами препятствовало увеличению ультраструктурных показателей формирования долговременной памяти при обучении (объем шипиков и площадь поверхности постсинаптического уплотнения) у мышей [100].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные выше результаты экспериментальных исследований являются неопровержимым доказательством того, что астроциты, будучи совместно с пре- и постсинаптическими структурами неотъемлемыми морфофункцио-

нальными составляющими трехкомпонентных синапсов, активно участвуют в их формировании и ремоделировании. Эти данные однозначно свидетельствуют о том, что динамические взаимоотношения между астроцитами и нейронами лежат в основе процессов морфофункционального развития ЦНС, и что формирование синапсов является ключевым событием нейрогенеза, поскольку определяет структуру и функцию нейрональных цепей на весь период жизни организма.

В то же время следует упомянуть о нерешенных вопросах, касающихся особенностей астроцитарных взаимодействий. Так, окончательно не выяснены молекулярные механизмы регуляции экспрессии астроцитарных синаптогенных факторов. Неизвестно, как адгезивные связи астроцитов с нейронами контролируют на синаптическом уровне формирование возбуждающих и тормозных контактов и баланс между возбуждением и торможением. Не раскрыты причины уменьшения числа тормозных синапсов при дефиците астроцитарных и нейрональных NrcAM (Neuronal Cell Adhesion Molecules) [101]. Не определено, как нейрон-астроцитарные контакты способствуют синаптогенезу в той или иной области мозга и на разных этапах его развития, а также насколько специфичность астроцитарных факторов синаптогенеза характерна для всего астроцита или же она обусловлена взаимодействием отдельных его компартментов с нейроном. Непонятно, насколько синаптогенетический потенциал одинаков у всех астроцитов. Решению этих и многих других вопросов вовлечения астроцитов в синаптогенез и пластичность межнейронных связей будет способствовать дальнейшее внедрение в практику эксперимента современных клеточных и молекулярно-генетических технологий.

Вклад авторов. Л.Г. Хаспеков — концепция, написание текста, поиск и аннотация статей; Л.Е. Фрумкина — написание текста, поиск и аннотация статей, подготовка рисунков.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abbink, M. R., van Deijk, A. F., Heine, V. M., Verheijen, M. H., and Korosi, A. (2019) The involvement of astrocytes in early-life adversity induced programming of the brain, *Glia*, **67**, 1637-1653, doi: 10.1002/glia.23625.

2. Perez-Catalan, N. A., Doe, C. Q., and Ackerman, S. D. (2021) The role of astrocyte-mediated plasticity in neural circuit development and function, *Neural Dev.*, **16**, 1, doi: 10.1186/s13064-020-00151-9.
3. Aleksandrova, M. A., and Sukhinich, K. K. (2022) Astrocytes of the brain: retinue plays the king, *Russ. J. Dev. Biol.*, **53**, 252-271, doi: 10.1134/S1062360422040026.
4. Fossati, G., Matteoli, M., and Menna, E. (2020) Astrocytic factors controlling synaptogenesis: a team play, *Cells*, **9**, 2173, doi: 10.3390/cells9102173.
5. Bayraktar, O. A., Fuentealba, L. C., Alvarez-Buylla, A., and Rowitch, D. H. (2015) Astrocyte development and heterogeneity, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **7**, a020362, doi: 10.1101/cshperspect.a020362.
6. Buosi, A. S., Matias, I., Araujo, A. P. B., Batista, C., and Gomes, F. C. A. (2018) Heterogeneity in synaptogenic profile of astrocytes from different brain regions, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 751-762, doi: 10.1007/s12035-016-0343-z.
7. 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.
8. Qi, C., Luo, L. D., Feng, I., and Ma, S. (2022) Molecular mechanisms of synaptogenesis, *Front. Synaptic Neurosci.*, **14**, 939793, doi: 10.3389/fnsyn.2022.939793.
9. Durkee, C. A., and Araque, A. (2019) Diversity and specificity of astrocyte-neuron communication, *Neuroscience*, **396**, 73-78, doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.11.010.
10. Hasan, U., and Singh, S. K. (2019) The astrocyte-neuron interface: An overview on molecular and cellular dynamics controlling formation and maintenance of the tripartite synapse, *Methods Mol. Biol.*, **1938**, 3-18, doi: 10.1007/978-1-4939-9068-9_1.
11. Meyer-Franke, A., Kaplan, M. R., Pfrieger, F. W., and Barres, B. A. (1995) Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture, *Neuron*, **15**, 805-819, doi: 10.1016/0896-6273(95)90172-8.
12. Nägler, K., Mauch, D. H., and Pfrieger, F. W. (2001) Glia-derived signals induce synapse formation in neurones of the rat central nervous system, *J. Physiol.*, **533**, 665-679, doi: 10.1111/j.1469-7793.2001.00665.x.
13. Pfrieger, F. W., and Barres, B. A. (1997) Synaptic efficacy enhanced by glial cells *in vitro*, *Science*, **277**, 1684-1687, doi: 10.1126/science.277.5332.1684.
14. Johnson, M. A., Weick, J. P., Pearce, R. A., and Zhang, S. C. (2007) Functional neural development from human embryonic stem cells: accelerated synaptic activity via astrocyte coculture, *J. Neurosci.*, **27**, 3069-3077, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4562-06.2007.
15. Farhy-Tselnicker, I., and Allen, N. J. (2018) Astrocytes, neurons, synapses: a tripartite view on cortical circuit development, *Neural Dev.*, **13**, 7, doi: 10.1186/s13064-018-0104-y.
16. Saint-Martin, M., and Goda, Y. (2022) Astrocyte-synapse interactions and cell adhesion molecules, *FEBS J.*, doi: 10.1111/febs.16540.
17. Tan, C. X., and Eroglu, C. (2021) Cell adhesion molecules regulating astrocyte-neuron interactions, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **69**, 170-177, doi: 10.1016/j.conb.2021.03.015.
18. Augusto-Oliveira, M., Arrifa, A., and Crespo-Lopez, M. E. (2020) Astroglia-specific contributions to the regulation of synapses, cognition and behavior, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **118**, 331-357, doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.07.039.
19. Hughes, E. G., Elmariah, S. B., and Balice-Gordon, R. J. (2010) Astrocyte secreted proteins selectively increase hippocampal GABAergic axon length, branching, and synaptogenesis, *Mol. Cell. Neurosci.*, **43**, 136-145, doi: 10.1016/j.mcn.2009.10.004.
20. Shan, L., Zhang, T., Fan, K., Cai, W., and Liu, H. (2021) Astrocyte-neuron signaling in synaptogenesis, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **9**, 680301, doi: 10.3389/fcell.2021.680301.
21. Adams, J. C. (2001) Thrombospondins: multifunctional regulators of cell interactions, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **17**, 25-51, doi: 10.1146/annurev.cellbio.17.1.25.
22. Christopherson, K. S., Ullian, E. M., Stokes, C. C., Mullowney, C. E., Hell, J. W., Agah, A., Lawler, J., Moshier, D. F., Bornstein, P., and Barres, B. A. (2005) Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis, *Cell*, **120**, 421-433, doi: 10.1016/j.cell.2004.12.020.
23. Risher, W. C., and Eroglu, C. (2012) Thrombospondins as key regulators of synaptogenesis in the central nervous system, *Matrix Biol.*, **31**, 170-177, doi: 10.1016/j.matbio.2012.01.004.
24. Eroglu, C., Allen, N. J., Susman, M. W., O'Rourke, N. A., Park, C. Y., Ozkan, E., Chakraborty, C., Mulinyawe, S. B., Annis, D. S., Huberman, A. D., Green, E. M., Lawler, J., Dolmetsch, R., Garcia, K. C., Smith, S. J., Luo, Z. D., Rosenthal, A., Moshier, D. F., and Barres, B. A. (2009) Gabapentin receptor alpha2delta-1 is a neuronal thrombospondin receptor responsible for excitatory CNS synaptogenesis, *Cell*, **139**, 380-392, doi: 10.1016/j.cell.2009.09.025.
25. Risher, W. C., and Eroglu, C. (2020) Astrocytes and synaptogenesis, in *Synapse Development and Maturation*, 2nd Edition, Acad. Press, pp. 55-75, doi: 10.1016/B978-0-12-823672-7.00003-X.
26. Risher, W. C., Kim, N., Koh, S., Choi, J. E., Mitev, P., Spence, E. F., Pilaz, L. J., Wang, D., Feng, G., Silver, D. L., Soderling, S. H., Yin, H. H., and Eroglu, C. (2018) Thrombospondin receptor $\alpha 2\delta$ -1 promotes synaptogenesis and spinogenesis via postsynaptic Rac1, *J. Cell. Biol.*, **217**, 3747-3765, doi: 10.1083/jcb.201802057.
27. Xu, J., Xiao, N., and Xia, J. (2010) Thrombospondin 1 accelerates synaptogenesis in hippocampal neurons

- through neuroligin 1, *Nat. Neurosci.*, **13**, 22-24, doi: 10.1038/nn.2459.
28. Stogsdill, J. A., Ramirez, J., Liu, D., Kim, Y. H., Baldwin, K. T., Enustun, E., Ejikeme, T., Ji, R. R., and Eroglu, C. (2017) Astrocytic neuroligins control astrocyte morphogenesis and synaptogenesis, *Nature*, **551**, 192-197, doi: 10.1038/nature24638.
 29. Stogsdill, J. A., and Eroglu, C. (2017) The interplay between neurons and glia in synapse development and plasticity, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **42**, 1-8, doi: 10.1016/j.conb.2016.09.016.
 30. Kucukdereli, H., Allen, N. J., Lee, A. T., Feng, A., Ozlu, M. I., Conatser, L. M., Chakraborty, C., Workman, G., Weaver, M., Sage, E. H., Barres, B. A., and Eroglu, C. (2011) Control of excitatory CNS synaptogenesis by astrocyte-secreted proteins Hevin and SPARC, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, E440-E449, doi: 10.1073/pnas.1104977108.
 31. Jones, E. V., Bernardinelli, Y., Tse, Y. C., Chierzi, S., Wong, T. P., and Murai, K. K. (2011) Astrocytes control glutamate receptor levels at developing synapses through SPARC-beta-integrin interactions, *J. Neurosci.*, **31**, 4154-4165, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4757-10.2011.
 32. Singh, S. K., Stogsdill, J. A., Pulimood, N. S., Dingsdale, H., Kim, Y. H., Pilaz, L. J., Kim, I. H., Manhaes, A. C., Rodrigues, W. S. Jr., Pamukcu, A., Enustun, E., Ertuz, Z., Scheiffle, P., Soderling, S. H., Silver, D. L., Ji, R. R., Medina, A. E., and Eroglu, C. (2016) Astrocytes assemble thalamocortical synapses by bridging NRX1 α and NL1 via Hevin, *Cell*, **164**, 183-196, doi: 10.1016/j.cell.2015.11.034.
 33. Gan, K. J., and Südhof, T. C. (2020) SPARCL1 promotes excitatory but not inhibitory synapse formation and function independent of neurexins and neuroligins, *J. Neurosci.*, **40**, 8088-8102, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0454-20.2020.
 34. 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.
 35. Allen, N. J., Bennett, M. L., Foo, L. C., Wang, G. X., Chakraborty, C., Smith, S. J., and Barres, B. A. (2012) Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via GluA1 AMPA receptors, *Nature*, **486**, 410-414, doi: 10.1038/nature11059.
 36. Farhy-Tselnicker, I., van Casteren, A. C. M., Lee, A., Chang, V. T., Aricescu, A. R., and Allen, N. J. (2017) Astrocyte-secreted glypican 4 regulates release of neuronal pentraxin 1 from axons to induce functional synapse formation, *Neuron*, **96**, 428-445, doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.053.
 37. Ko, J. S., Pramanik, G., Um, J. W., Shim, J. S., Lee, D., Kim, K. H., Chung, G. Y., Condomitti, G., Kim, H. M., Kim, H., de Wit, J., Park, K. S., Tabuchi, K., and Ko, J. (2015) PTP σ functions as a presynaptic receptor for the glypican-4/LRRTM4 complex and is essential for excitatory synaptic transmission, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 1874-1879, doi: 10.1073/pnas.1410138112.
 38. Roppongi, R. T., Dhume, S. H., Padmanabhan, N., Silwal, P., Zahra, N., Karimi, B., Bomkamp, C., Patil, C. S., Champagne-Jorgensen, K., Twilley, R. E., Zhang, P., Jackson, M. F., and Siddiqui, T. J. (2020) LRRTMs organize synapses through differential engagement of neurexin and PTP σ , *Neuron*, **106**, 108-125, doi: 10.1016/j.neuron.2020.05.003.
 39. Jean, Y. Y., Lercher, L. D., and Dreyfus, C. F. (2008) Glutamate elicits release of BDNF from basal forebrain astrocytes in a process dependent on metabotropic receptors and the PLC pathway, *Neuron Glia Biol.*, **4**, 35-42, doi: 10.1017/S1740925X09000052.
 40. De Pins, B., Cifuentes-Díaz, C., Farah, A. T., López-Molina, L., Montalbán, E., Sancho-Balsells, A., López, A., Ginés, S., Delgado-García, J. M., Alberch, J., Gruart, A., Girault, J. A., and Giralt, A. (2019) Conditional BDNF delivery from astrocytes rescues memory deficits, spine density, and synaptic properties in the 5xFAD mouse model of Alzheimer's disease, *J. Neurosci.*, **39**, 2441-2458, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2121-18.2019.
 41. Diniz, L. P., Tortelli, V., Garcia, M. N., Araújo, A. P., Melo, H. M., Silva, G. S., Felice, F. G., Alves-Leon, S. V., Souza, J. M., Romão, L. F., Castro, N. G., and Gomes, F. C. (2014) Astrocyte transforming growth factor beta 1 promotes inhibitory synapse formation via CaM kinase II signaling, *Glia*, **62**, 1917-1931, doi: 10.1002/glia.22713.
 42. Diniz, L. P., Almeida, J. C., Tortelli, V., Vargas Lopes, C., Setti-Perdigão, P., Stipursky, J., Kahn, S. A., Romão, L. F., de Miranda, J., Alves-Leon, S. V., de Souza, J. M., Castro, N. G., Panizzutti, R., and Gomes, F. C. (2012) Astrocyte-induced synaptogenesis is mediated by transforming growth factor β signaling through modulation of D-serine levels in cerebral cortex neurons, *J. Biol. Chem.*, **287**, 41432-41445, doi: 10.1074/jbc.M112.380824.
 43. Diniz, L. P., Matias, I. C., Garcia, M. N., and Gomes, F. C. (2014) Astrocytic control of neural circuit formation: highlights on TGF-beta signaling, *Neurochem. Int.*, **78**, 18-27, doi: 10.1016/j.neuint.2014.07.008.
 44. Patel, M. R., and Weaver, A. M. (2021) Astrocyte-derived small extracellular vesicles promote synapse formation via fibulin-2-mediated TGF- β signaling, *Cell. Rep.*, **34**, 108829, doi: 10.1016/j.celrep.2021.108829.
 45. Blanco-Suarez, E., Liu, T. F., Kopelevich, A., and Allen, N. J. (2018) Astrocyte-secreted chordin-like 1 drives synapse maturation and limits plasticity by increasing synaptic GluA2 AMPA receptors, *Neuron*, **100**, 1116-1132, doi: 10.1016/j.neuron.2018.09.043.
 46. Garrett, A. M., and Weiner, J. A. (2009) Control of CNS synapse development by γ -protocadherin-mediated astrocyte-neuron contact, *J. Neurosci.*, **29**, 11723-11731, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2818-09.2009.

47. Miralles, C. P., Taylor, M. J., Bear, J. Jr., Fekete, C. D., George, S., Li, Y., Bonhomme, B., Chiou, T. T., and De Blas, A. L. (2020) Expression of protocadherin- γ C4 protein in the rat brain, *J. Comp. Neurol.*, **528**, 840-864, doi: 10.1002/cne.24783.
48. Molumby, M. J., Anderson, R. M., Newbold, D. J., Koblesky, N. K., Garrett, A. M., Schreiner, D., Radley, J. J., and Weiner, J. A. (2017) γ -Protocadherins interact with neuroligin-1 and negatively regulate dendritic spine morphogenesis, *Cell. Rep.*, **18**, 2702-2714, doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.060.
49. Mauch, D. H., Nägler, K., Schumacher, S., Göritz, C., Müller, E. C., Otto, A., and Pfriege, F. W. (2001) CNS synaptogenesis promoted by glia-derived cholesterol, *Science*, **294**, 1354-1357, doi: 10.1126/science.294.5545.1354.
50. Goritz, C., Mauch, D. H., and Pfriege, F. W. (2005) Multiple mechanisms mediate cholesterol-induced synaptogenesis in a CNS neuron, *Mol. Cell Neurosci.*, **29**, 190-201, doi: 10.1016/j.mcn.2005.02.006.
51. Goritz, C., Mauch, D. H., Nägler, K., and Pfriege, 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.
52. Pfriege, F. W. (2003) Role of cholesterol in synapse formation and function, *Biochim. Biophys. Acta*, **1610**, 271-280, doi: 10.1126/science.277.5332.1684.
53. Wang, Y., Fu, A. K. Y., and Ip, N. Y. (2022) Instructive roles of astrocytes in hippocampal synaptic plasticity: neuronal activity-dependent regulatory mechanisms, *FEBS J.*, **289**, 2202-2218, doi: 10.1111/febs.15878.
54. Van Deijk, A. F., Camargo, N., Timmerman, J., Heistek, T., Brouwers, J. F., Mogavero, F., Mansvelter, 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.
55. Ferris, H. A., Perry, R. J., Moreira, G. V., Shulman, G. I., Horton, J. D., and Kahn, C. R. (2017) Loss of astrocyte cholesterol synthesis disrupts neuronal function and alters whole-body metabolism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 1189-1194, doi: 10.1073/pnas.1620506114.
56. 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.
57. Chiareli, R. A., Carvalho, G. A., Marques, B. L., Mota, L. S., Oliveira-Lima, O. C., Gomes, R. M., Birbrair, A., Gomez, R. S., Simão, F., Klempin, F., Leist, M., and Pinto, M. C. X. (2021) The role of astrocytes in the neurorepair process, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **9**, 665795, doi: 10.3389/fcell.2021.665795.
58. Fossati, G., Pozzi, D., Canzi, A., Mirabella, F., Valentino, S., Morini, R., Ghirardini, E., Filipello, F., Moretti, M., Gotti, C., Annis, D. S., Mosher, D. F., Garlanda, C., Bottazzi, B., Taraboletti, G., Mantovani, A., Matteoli, M., and Menna, E. (2019) Pentraxin 3 regulates synaptic function by inducing AMPA receptor clustering via ECM remodeling and β 1-integrin, *EMBO J.*, **38**, e99529, doi: 10.15252/embj.201899529.
59. Carmona, M. A., Murai, K. K., Wang, L., Roberts, A. J., and Pasquale, E. B. (2009) Glial ephrin-A3 regulates hippocampal dendritic spine morphology and glutamate transport, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 12524-12529, doi: 10.1073/pnas.0903328106.
60. Murai, K. K., and Pasquale, E. B. (2011) Eph receptors and ephrins in neuron-astrocyte communication at synapses, *Glia*, **59**, 1567-1578, doi: 10.1002/glia.21226.
61. Kania, A., and Klein, R. (2016) Mechanisms of ephrin-Eph signalling in development, physiology and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **17**, 240-256, doi: 10.1038/nrm.2015.16.
62. Nguyen, A. Q., Koeppen, J., Woodruff, S., Mina, K., Figueroa, Z., and Ethell, I. M. (2020) Astrocytic ephrin-b1 controls synapse formation in the hippocampus during learning and memory, *Front. Synaptic Neurosci.*, **12**, 10, doi: 10.3389/fnsyn.2020.00010.
63. Nguyen, A. Q., Sutley, S., Koeppen, J., Mina, K., Woodruff, S., Hanna, S., Vengala, A., Hickmott, P. W., Obenaus, A., and Ethell, I. M. (2020) Astrocytic ephrin-B1 controls excitatory-inhibitory balance in developing hippocampus, *J. Neurosci.*, **40**, 6854-6871, doi: 10.3389/fnsyn.2020.00010.
64. Hung, C. Y., Hsu, T. I., Chuang, J. Y., Su, T. P., Chang, W. C., and Hung, J. J. (2020) Sp1 in astrocyte is important for neurite outgrowth and synaptogenesis, *Mol. Neurobiol.*, **57**, 261-277, doi: 10.1007/s12035-019-01694-7.
65. Espírito-Santo, S., Coutinho, V. G., Dezonne, R. S., Stipursky, J., Dos Santos-Rodrigues, A., Batista, C., Paes-de-Carvalho, R., Fuss, B., and Gomes, F. C. A. (2021) Astrocytes as a target for Nogo-A and implications for synapse formation *in vitro* and in a model of acute demyelination, *Glia*, **69**, 1429-1443, doi: 10.1002/glia.23971.
66. Xie, Y., Kuan, A. T., Wang, W., Herbert, Z. T., Mosto, O., Olukoya, O., Adam, M., Vu, S., Kim, M., Tran, D., Gómez, N., Charpentier, C., Sorour, I., Lacey, T. E., Tolstorukov, M. Y., Sabatini, B. L., Lee, W. A., and Harwell, C. C. (2022) Astrocyte-neuron crosstalk through Hedgehog signaling mediates cortical synapse development, *Cell. Rep.*, **38**, 110416, doi: 10.1016/j.celrep.2022.110416.
67. Zehnder, T., Petrelli, F., Romanos, J., De Oliveira Figueiredo, E. C., Lewis, T. L., Déglon, N., Polleux, F., Santello, M., and Bezzi, P. (2021) Mitochondrial biogenesis in developing astrocytes regulates astrocyte maturation and synapse

- formation, *Cell. Rep.*, **35**, 108952, doi: 10.1016/j.celrep.2021.108952.
68. Risher, W. C., Patel, S., Kim, I. H., Uezu, A., Bhagat, S., Wilton, D. K., Pilaz, L. J., Singh Alvarado, J., Calhan, O. Y., Silver, D. L., Stevens, B., Calakos, N., Soderling, S. H., and Eroglu, C. (2014) Astrocytes refine cortical connectivity at dendritic spines, *Elife*, **3**, e04047, doi: 10.7554/eLife.04047.
 69. Hennes, M., Lombaert, N., Wahis, J., Van den Haute, C., Holt, M. G., and Arckens, L. (2020) Astrocytes shape the plastic response of adult cortical neurons to vision loss, *Glia*, **68**, 2102-2118, doi: 10.1002/glia.23830.
 70. Lawal, O., Ulloa Severino, F. P., and Eroglu, C. (2022) The role of astrocyte structural plasticity in regulating neural circuit function and behavior, *Glia*, **70**, 1467-1483, doi: 10.1002/glia.24191.
 71. Lyon, K. A., and Allen, N. J. (2022) From synapses to circuits, astrocytes regulate behavior, *Front. Neural Circuits*, **15**, 786293, doi: 10.3389/fncir.2021.786293.
 72. Chicurel, M. E., Terrian, D. M., and Potter, H. (1993) mRNA at the synapse: analysis of a synaptosomal preparation enriched in hippocampal dendritic spines, *J. Neurosci.*, **13**, 4054-4063, doi: 10.1523/JNEUROSCI.13-09-04054.1993.
 73. Baldwin, K. T., and Eroglu, C. (2018) Astrocytes “chordinate” synapse maturation and plasticity, *Neuron*, **100**, 1010-1012, doi: 10.1016/j.neuron.2018.11.027.
 74. Bosworth, A. P., and Allen, N. J. (2017) The diverse actions of astrocytes during synaptic development, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **47**, 38-43, doi: 10.1016/j.conb.2017.08.017.
 75. Liu, X., Ying, J., Wang, X., Zheng, Q., Zhao, T., Yoon, S., Yu, W., Yang, D., Fang, Y., and Hua, F. (2021) Astrocytes in neural circuits: key factors in synaptic regulation and potential targets for neurodevelopmental disorders, *Front. Mol. Neurosci.*, **14**, 729273, doi: 10.3389/fnmol.2021.729273.
 76. Sancho, L., Contreras, M., and Allen, N. J. (2021) Glia as sculptors of synaptic plasticity, *Neurosci. Res.*, **167**, 17-29, doi: 10.1016/j.neures.2020.11.005.
 77. Durkee, C., Kofuji, P., Navarrete, M., and Araque, A. (2021) Astrocyte and neuron cooperation in long-term depression, *Trends Neurosci.*, **44**, 837-848, doi: 10.1016/j.tins.2021.07.004.
 78. Ota, Y., Zanetti, A. T., and Hallock, R. M. (2013) The role of astrocytes in the regulation of synaptic plasticity and memory formation, *Neural Plast.*, **2013**, 185463, doi: 10.1155/2013/185463.
 79. Henneberger, C., Papouin, T., Oliet, S. H., and Rusakov, D. A. (2010) Long-term potentiation depends on release of D-serine from astrocytes, *Nature*, **463**, 232-236, doi: 10.1038/nature08673.
 80. Adamsky, A., Kol, A., Kreisel, T., Doron, A., Ozeri-Engelhard, N., Melcer, T., Refaeli, R., Horn, H., Regev, L., Groysman, M., London, M., and Goshen, I. (2018) Astrocytic activation generates *de novo* neuronal potentiation and memory enhancement, *Cell*, **174**, 59-71, doi: 10.1016/j.cell.2018.05.002.
 81. Masuoka, T., Ikeda, R., and Konishi, S. (2019) Persistent activation of histamine H1 receptors in the hippocampal CA1 region enhances NMDA receptor-mediated synaptic excitation and long-term potentiation in astrocyte- and D-serine-dependent manner, *Neuropharmacology*, **151**, 64-73, doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.03.036.
 82. Cavaccini, A., Durkee, C., Kofuji, P., Tonini, R., and Araque, A. (2020) Astrocyte signaling gates long-term depression at corticostriatal synapses of the direct pathway, *J. Neurosci.*, **40**, 5757-5768, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2369-19.2020.
 83. Falcón-Moya, R., Pérez-Rodríguez, M., Prius-Mengual, J., Andrade-Talavera, Y., Arroyo-García, L. E., Pérez-Artés, R., Mateos-Aparicio, P., Guerra-Gomes, S., Oliveira, J. F., Flores, G., and Rodríguez-Moreno, A. (2020) Astrocyte-mediated switch in spike timing-dependent plasticity during hippocampal development, *Nat. Commun.*, **11**, 4388, doi: 10.1038/s41467-020-18024-4.
 84. Lee, C. J., Mannaioni, G., Yuan, H., Woo, D. H., Gingrich, M. B., and Traynelis, S. F. (2007) Astrocytic control of synaptic NMDA receptors, *J. Physiol.*, **581**, 1057-1081, doi: 10.1113/jphysiol.2007.130377.
 85. Park, H., Han, K. S., Seo, J., Lee, J., Dravid, S. M., Woo, J., Chun, H., Cho, S., Bae, J. Y., An, H., Koh, W., Yoon, B. E., Berlinguer-Palmini, R., Mannaioni, G., Traynelis, S. F., Bae, Y. C., Choi, S. Y., and Lee, C. J. (2015) Channel-mediated astrocytic glutamate modulates hippocampal synaptic plasticity by activating postsynaptic NMDA receptors, *Mol. Brain*, **8**, 7, doi: 10.1186/s13041-015-0097-y.
 86. Navarrete, M., Cuartero, M. I., Palenzuela, R., Draffin, J. E., Konomi, A., Serra, I., Colié, S., Castaño-Castaño, S., Hasan, M. T., Nebreda, Á. R., and Esteban, J. A. (2019) Astrocytic p38 α MAPK drives NMDA receptor-dependent long-term depression and modulates long-term memory, *Nat. Commun.*, **10**, 2968, doi: 10.1038/s41467-019-10830.
 87. Boué-Grabot, E., and Pankratov, Y. (2017) Modulation of central synapses by astrocyte-released ATP and postsynaptic P2X receptors, *Neural Plast.*, **2017**, 9454275, doi: 10.1155/2017/9454275.
 88. Crosby, K. M., Murphy-Royal, C., Wilson, S. A., Gordon, G. R., Bains, J. S., and Pittman, Q. J. (2018) Cholecystokinin switches the plasticity of GABA synapses in the dorsomedial hypothalamus via astrocytic ATP release, *J. Neurosci.*, **38**, 8515-8525, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0569-18.2018.
 89. Covelo, A., Eraso-Pichot, A., Fernández-Moncada, I., Serrat, R., and Marsicano, G. (2021) CB1R-dependent regulation of astrocyte physiology and astrocyte-neuron interactions, *Neuropharmacology*, **195**, 108678, doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108678.

90. Martin-Fernandez, M., Jamison, S., Robin, L. M., Zhao, Z., Martin, E. D., Aguilar, J., Benneyworth, M. A., Marsicano, G., and Araque, A. (2017) Synapse-specific astrocyte gating of amygdala-related behavior, *Nat. Neurosci.*, **20**, 1540-1548, doi: 10.1038/nn.4649.
91. Robin, L. M., Oliveira da Cruz, J. F., Langlais, V. C., Martin-Fernandez, M., Metna-Laurent, M., Busquets-Garcia, A., Bellocchio, L., Soria-Gomez, E., Papouin, T., Varilh, M., Sherwood, M. W., Belluomo, I., Balcells, G., Matias, I., Bosier, B., Drago, F., Van Eeckhaut, A., Smolders, I., Georges, F., Araque, A., Panatier, A., Oliet, S. H. R., and Marsicano, G. (2018) Astroglial CB1 receptors determine synaptic D-serine availability to enable recognition memory, *Neuron*, **98**, 935-944, doi: 10.1016/j.neuron.2018.04.034.
92. Durieux, L. J. A., Gilissen, S. R. J., and Arckens, L. (2022) Endocannabinoids and cortical plasticity: CB1R as a possible regulator of the excitation/inhibition balance in health and disease, *Eur. J. Neurosci.*, **55**, 971-988, doi: 10.1111/ejn.15110.
93. Balschun, D., Wetzel, W., Del Rey, A., Pitossi, F., Schneider, H., Zuschratter, W., and Besedovsky, H. O. (2004) Interleukin-6: a cytokine to forget, *FASEB J.*, **18**, 1788-1790, doi: 10.1096/fj.04-1625fje.
94. Quintana, A., Erta, M., Ferrer, B., Comes, G., Giral, M., and Hidalgo, J. (2013) Astrocyte-specific deficiency of interleukin-6 and its receptor reveal specific roles in survival, body weight and behavior, *Brain Behav. Immun.*, **27**, 162-173, doi: 10.1016/j.bbi.2012.10.011.
95. Roberts, A. J., Khom, S., Bajo, M., Vlkolinsky, R., Polis, I., Cates-Gatto, C., Roberto, M., and Gruol, D. L. (2019) Increased IL-6 expression in astrocytes is associated with emotionality, alterations in central amygdala GABAergic transmission, and excitability during alcohol withdrawal, *Brain Behav. Immun.*, **82**, 188-202, doi: 10.1016/j.bbi.2019.08.185.
96. Alberini, C. M., Cruz, E., Descalzi, G., Bessières, B., and Gao, V. (2018) Astrocyte glycogen and lactate: new insights into learning and memory mechanisms, *Glia*, **66**, 1244-1262, doi: 10.1002/glia.23250.
97. Suzuki, A., Stern, S. A., Bozdagi, O., Huntley, G. W., Walker, R. H., Magistretti, P. J., and Alberini, C. M. (2011) Astrocyte-neuron lactate transport is required for long-term memory formation, *Cell*, **144**, 810-823, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.018.
98. Descalzi, G., Gao, V., Steinman, M. Q., Suzuki, A., and Alberini, C. M. (2019) Lactate from astrocytes fuels learning-induced mRNA translation in excitatory and inhibitory neurons, *Commun. Biol.*, **2**, 247, doi: 10.1038/s42003-019-0495-2.
99. Duran, J., Brewer, M. K., Hervera, A., Gruart, A., Del Rio, J. A., Delgado-García, J. M., and Guinovart, J. J. (2020) Lack of astrocytic glycogen alters synaptic plasticity but not seizure susceptibility, *Mol. Neurobiol.*, **57**, 4657-4666, doi: 10.1007/s12035-020-02055-5.
100. Vezzoli, E., Cali, C., De Roo, M., Ponzoni, L., Sogne, E., Gagnon, N., Francolini, M., Braidà, D., Sala, M., Müller, D., Falqui, A., and Magistretti, P. J. (2020) Ultrastructural evidence for a role of astrocytes and glycogen-derived lactate in learning-dependent synaptic stabilization, *Cereb. Cortex*, **30**, 2114-2127, doi: 10.1093/cercor/bhz226.
101. Takano, T., Wallace, J. T., Baldwin, K. T., Purkey, A. M., Uezu, A., Courtland, J. L., Soderblom, E. J., Shimogori, T., Maness, P. F., Eroglu, C., and Soderling, S. H. (2020) Chemico-genetic discovery of astrocytic control of inhibition *in vivo*, *Nature*, **588**, 296-302, doi: 10.1038/s41586-020-2926-0.

MOLECULAR MECHANISMS OF ASTROCYTE INVOLVEMENT IN SYNAPTOGENESIS AND BRAIN SYNAPTIC PLASTICITY

Review

L. G. Khaspekov* and L. E. Frumkina

Research Center of Neurology, 125367 Moscow, Russia; e-mail: khaspekleon@mail.ru

Astrocytes perform a wide range of important functions in the brain. As structural and functional components of synapses, astrocytes secrete various factors (proteins, lipids, small molecules, etc.) that bind to neuronal receptor and contribute to synaptogenesis and regulation of synaptic contacts. Astrocytic factors play a key role in the formation of neural networks undergoing short- and long-term synaptic morphological and functional rearrangements essential in the memory formation and behavior. The review summarizes the data on the molecular mechanisms mediating the involvement of astrocyte-secreted factors in synaptogenesis in the brain and provides up-to-date information on the role of astrocytes and astrocytic synaptogenic factors in the long-term plastic rearrangements of synaptic contacts.

Keywords: astrocytes, synaptogenesis, synaptic plasticity

АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ГЕНОВ В НЕЙРАЛЬНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ИНДУЦИРОВАННЫХ ПЛЮРИПОТЕНТНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ПАЦИЕНТОВ С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА

© 2023 В.Б. Федосеева**, Е.В. Новосадова#, В.В. Ненашева#, Л.В. Новосадова,
И.А. Гривенников, В.З. Тарангул

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
123182 Москва, Россия; электронная почта: fvb@img.msk.ru

Поступила в редакцию 31.10.2022

После доработки 03.03.2023

Принята к публикации 07.03.2023

Болезнь Паркинсона (БП) является одним из наиболее распространённых в мире нейродегенеративных заболеваний. Несмотря на многочисленные исследования, причины этой патологии остаются до конца неизвестными. Это, кроме прочего, связано с трудностью получения биологического материала для анализа. Большим потенциалом для изучения молекулярных событий, лежащих в основе патогенеза БП, обладают культуры нейральных клеток, получаемые из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК) человека. В настоящей работе был проведён биоинформатический анализ данных, полученных с помощью технологии секвенирования полного транскриптома (RNA-seq) при исследовании нейральных предшественников (НП), полученных из ИПСК здоровых доноров (ЗД) и пациентов с БП, несущих различные мутации, которые являются частой причиной семейной формы БП. Было обнаружено, что в клетках НП, полученных от пациентов с БП, в отличие от ЗД, значительно повышен уровень транскрипции множества генов, активно экспрессирующихся при нормальном эмбриональном развитии нервной системы. Биоинформатические данные в целом подтверждаются с помощью ПЦР в реальном времени. Полученные результаты позволяют предположить, что одной из причин БП может быть сдвиг паттерна экспрессии генов в нейральных клетках в сторону эмбриональной программы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: болезнь Паркинсона, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, нейральные предшественники, RNA-seq, дифференциальная транскрипция генов, ПЦР, биоинформатический анализ.

DOI: 10.31857/S0320972523040073, EDN: AKRDJU

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – распространённое прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, характеризующееся преимущественной гибелью дофаминергических (ДА) нейронов в центральной нервной системе. Это заболевание ассоциировано с возрастом и является одной из значимых причин инвалидизации пожилых лиц в современном обществе [1]. На основании имеющихся на сегодняшний день экспериментальных данных

построено множество гипотез о механизмах, приводящих к развитию БП [2]. Однако основная причина этого заболевания по-прежнему остаётся неизвестной. Выявление механизмов системного уровня, которые приводят к БП, является важным шагом на пути к разработке новых терапевтических средств.

Для исследований БП используются разнообразные модели. В последние годы для этой цели стали применяться индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), из которых можно получать ней-

Принятые сокращения: БП – болезнь Паркинсона; ДА нейроны – дофаминергические нейроны; ДЭГ – дифференциально экспрессирующиеся гены; ЗД – здоровый донор; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; НП – нейральные предшественники; FDR – частота ложных обнаружений.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

Таблица 1. Характеристика пациентов с БП и ЗД

Линии ИПСК	Описание пациентов с БП и ЗД	Генотип	Название клеточной линии НП
IPSRG2L [9]	здоровый мужчина, 60 лет	здоровый	NP RG2L
IPSHD1.1S [9]	здоровая женщина, 18 лет	здоровый	NP HD 1.1S
IPSPD3.9L [9]	здоровая женщина, 26 лет	здоровый	NP RFD 3.9 L
IPSPDPS8 [9]	женщина с БП, начало заболевания – 30 лет, биопсия – 41 год	гомозиготная делеция EX8 в гене <i>PARK2</i>	NP PDS13
IPSPDPS2d [9]	мужчина с БП, начало заболевания – 38 лет, биопсия – 40 лет	гетерозиготная делеция EX2 в гене <i>PARK2</i>	NP PDS14
IPSPDL2.15L [11]	мужчина с БП, начало заболевания – 50 лет, биопсия – 63 года	мутация G2019S в гене <i>PARK8</i>	NP PDL2.15L
IPSPDG1.1S [11]	мужчина с БП, начало заболевания – 44 года, биопсия – 60 лет	мутация N370S в гене <i>GBA</i>	NP PDG1.1S
IPSPDSP1.1S [11]	женщина с БП, начало заболевания – 57 лет, биопсия – 66 лет	отсутствуют известные мутации	NP PDSP1.1S

ральные предшественники (НП), терминально дифференцированные нейроны (ТДН) и клетки глии пациентов с БП и здоровых доноров (ЗД) [3–7].

Среди методов, используемых для изучения механизмов БП, наиболее информативным считается метод высокопроизводительного секвенирования полного транскриптома (RNA-seq). С помощью этого метода можно получать данные о дифференциальной экспрессии генов в норме и при патологии, что позволяет выявлять гены, прямо или косвенно вовлечённые в патологический процесс.

Первоначальный анализ дифференциально экспрессирующихся генов (ДЭГ) в нейральных клетках, полученных из ИПСК двух пациентов с БП и трёх ЗД, привлек наше внимание к повышенной транскрипции многих функционирующих преимущественно на эмбриональной стадии развития *HOX*-генов у пациентов с БП при практически полном отсутствии экспрессии этих генов в клетках ЗД [8]. Биоинформатический анализ, проведённый в настоящей работе, показал, что, наряду с *HOX*-генами, многие другие «эмбриональные» гены повышено экспрессируются в клетках НП, дифференцированных из ИПСК пациентов с БП, по сравнению с соответствующими клетками от ЗД. Полученные данные позволяют предположить, что одной из причин БП может

быть аномальный процесс, выражающийся в повышенной экспрессии множества эмбриональных генов, участвующих в дифференцировке нейральных клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биоинформатический анализ. В предыдущей работе [9] нами опубликованы транскрипционные профили культур клеток НП и ТДН, которые были получены из ИПСК трёх ЗД и двух пациентов с БП, несущих различные мутации в гене *PARK2*, с помощью технологии RNA-seq [3, 7, 10]. Данные об этих и других пациентах с БП и ЗД, материал которых был использован в настоящей работе, приведены в таблице 1.

В ранее опубликованной статье [9] содержатся исходные нуклеотидные последовательности транскриптомов, преобразованные в формат FASTQ. Секвенирование ридов осуществлялось с двух концов каждого фрагмента. Необработанные считывания нуклеотидных последовательностей РНК были депонированы в GSE181029 серии Gene Expression Omnibus (GEO). Обрезку парных считываний для качественной и количественной оценок по сравнению с аннотацией генома *Homo sapiens* GRCh38.13 проводили, как описано ранее [9].

Таблица 2. Структура праймеров для ПЦР

Гены	Последовательности праймеров (F – прямые, R – обратные)	T, °C
<i>18s RNA</i>	F: CGGCTACCACATCCAAGGAA R: GCTGGAATTACCGCGGCT	60
<i>IRX2</i>	F: GCGCCTCAAGAAGGAGAACA R: CTGATCCCTTCGTCCTCTGC	60
<i>LHX1</i>	F: GCCAAGAGAACAGCCTTCACTC R: GGTCGTCATTCTCGTTGCTACC	60
<i>NEUROG1</i>	F: GCCTCCGAAGACTTCACTTACC R: GGAAAGTAACAGTGTCTACAAAGG	60
<i>PITX1</i>	F: GCGAGTCGTCTGACACGGA R: CAACTGCTGGCTTGTGAAGTG	55
<i>TFAP2A</i>	F: GACCTCTCGATCCACTCCTTAC R: GAGACGGCATTGCTGTTGGACT	60
<i>TFAP2B</i>	F: ATCTATGAGGACCGGCACGA R: CTCGAGTAGGGTCCCTTGGGA	60
<i>PTN</i>	F: CAAGCAAACCATGAAGACCCAG R: CTCGCTTCAGACTTCCAGTTCT	55

С использованием пакета «edgeR» [12] были получены данные по ДЭГ клеточных линий, полученных у пациентов с БП и ЗД. Количество прочтений нормализовали с использованием алгоритма ТММ в R-пакете «edgeR» [12]. В качестве фильтра выбирали количество картированных прочтений (ридов) на миллион фрагментов (CPM > 1,5) для генов, кодирующих белки. Для анализа экспрессии генных серий были выбраны следующие параметры ограничений: отношение числа картированных ридов FC (fold change) у пациентов с БП к аналогичному числу у ЗД ($|\log_2(FC)| > 1$) и частоты ложных обнаружений (FDR < 0,05) и Pval (< 0,05). Данные по ДЭГ анализировали с использованием возможностей Web-инструмента анализа генных серий (Gene Set AnaLysis Toolkit), доступного на сайте <http://WebGestalt.org>. При обработке наших данных из множества баз данных этого сервера самые высокие значения с минимальными частотами ложных обнаружений показали темы «Биологический процесс» и «Молекулярная функция» из ресурса Gene Ontology (GO).

ПЦР-анализ в режиме реального времени. Суммарную клеточную РНК экстрагировали из клеток с помощью набора реактивов для очистки РНК Trizol («Thermo Fisher Scientific», США), как рекомендовано производителем, с последующей обработкой ДНКазой I («Thermo Fisher Scientific»). Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали на 2 мкг суммарной

РНК с использованием обратной транскриптазы MMLV («Евроген», Россия) и случайных гексапраймеров. Полученную кДНК амплифицировали с использованием системы LightCycler («Roche», Германия) и реакционной смеси qPCRmix-HS SYBR («Евроген»). Условия реакции были следующими: денатурация при 95 °C (3 мин), затем 40 циклов (95 °C, 15 с; 60–65 °C, 20 с; и 72 °C, 45 с). Использовали реакционную смесь qPCRmix-HS SYBR («Евроген»). Количественную оценку относительного уровня мРНК целевых генов проводили с использованием сравнительного метода 2-ΔCt [13]. В качестве референсного гена использовали ген 18S рРНК. Праймеры для ПЦР были подобраны с помощью ресурса NCBI Primer-BLAST (таблица 2). Результаты ПЦР представлены в виде среднего значения ± σ (стандартное отклонение) по трём экспериментам.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ранее нами с помощью технологии RNA-seq были получены данные по ДЭГ НП, полученных от пациентов с БП и ЗД. Анализ полученных данных с помощью ресурса GO выявил категории, в которых находятся ДЭГ с наиболее высокой транскрипцией в НП от пациентов с БП по сравнению со ЗД (таблица 3). Наше предыдущее исследование показало,

Таблица 3. Список генов (дополнительно к *HOX*-генам) по категориям ресурса GO, имеющих более высокий уровень транскрипции в НП от пациентов с БП по сравнению со ЗД

Шифр категории	Название категории	Дифференциально экспрессирующиеся гены	Достоверность
GO:00355326	связывание с энхансером	<i>IRX5, OSR1, TFAP2A</i>	FDR = 0; Pval = 0
GO:0001228	активатор связывания РНК-полимеразы II с ДНК	<i>EBF1-3, FOXF1, GATA4, GSX1, MEIS1, MYT1, NHLH1, NHLH2, ONECUT1, ONECUT2, PITX1, PITX2, POU4F1, TBX5, TFAP2A, WT1</i>	FDR = 0; Pval = 0
GO:0033613	фактор активации транскрипции	<i>GATA4, NHLH2, PITX2</i>	FDR = 0; Pval = 0
GO:0048706	развитие эмбриональной скелетной системы	<i>IRX5, OSR1, TFAP2A</i>	FDR = 0; Pval = 0
GO:0048705	морфогенез скелетной системы	<i>IRX5, OSR1, TFAP2A, MGP, NPPC, NEUROG1, TBX15, LHX5, COL14A1</i>	FDR = 0; Pval = 0
GO:0007389	паттерн процессов спецификации	<i>PITX2, WT1, GATA4, GATA5, FOXF1, PCDH8, LBX1, OSR1, GDF3, HES5, IRX3, GSX2, DLL3, TBX18, NEUROG1, LHX1, WNT6, AMHR2, HES3, TBX5, EVX1, PAX7, DLL1, IRX2, ASCL1</i>	FDR = 0; Pval = 0
GO:0048568	развитие эмбриональных органов	<i>FOXF1, GATA4, LBX1, IRX5, OSR1, FRZB, GJA5, GDF3, TFAP2A, POU3F4, STRA6, TBX15, NEUROG1, LHX1, PKDCC, DLL1, ALDH1A2, HNF1B, MYO3A, PROX1</i>	FDR < 0,001; Pval = 0
GO:0021675	развитие нервной системы	<i>POU4F1, PHOX2A, TFAP2A, NEUROG1, 2, NTRK1, HES3, NHLH1, 2, CHRN2, UNC13A, PITX2, PAX3, 7</i>	FDR < 0,001; Pval = 0

что в этих категориях присутствуют преимущественно гены *HOX*-кластеров [8]. Биоинформатический анализ, проведённый в настоящей работе, позволил выявить, кроме *HOX*-генов, дополнительно 87 генов с существенно более высоким уровнем транскрипции в НП от пациентов с БП по сравнению со ЗД (таблица 3), которые также относятся к этим категориям.

Для многих из ДЭГ в НП пациентов с БП повышенная экспрессия в норме характерна преимущественно для эмбриональных стадий развития. Затем в норме многие из этих генов сильно снижают свою активность во взрослых нейральных клетках. На рис. 1 приведены данные по ДЭГ, относящиеся к этим категориям GO-ресурса. Были отобраны ДЭГ (таблица 3), имеющие TPM > 10 (TPM – число транскриптов на 1 миллион картированных фрагментов) у обоих пациентов с БП, несущих мутации в гене *PARK2*, а также ДЭГ, которые имеют отношение к развитию нервной системы.

Среди генов, которые повышено транскрибируются в НП пациентов с БП по сравнению со ЗД (рис. 1), выделяется большой набор генов, кодирующих факторы тран-

скрипции (ФТ) (*TFAP2A, TFAP2B, NEUROG1, NEUROG2, ASCL1, PITX1, PITX2, LHX1, PAX7, NHLH2, OSR1, OSR2, IRX2, IRX3, IRX5, DATA6*).

Был проведён детальный анализ нуклеотидных мотивов связывания этих ФТ с регуляторными областями генов, повышенно экспрессирующихся в НП, от пациентов с БП по сравнению со ЗД. Для такого анализа использовали базу данных по последовательностям узнавания (респонсивных элементов) HOCOMO (Homo sapiens Comprehensive MOdel Collection [14], release 10) и нуклеотидные последовательности регуляторных областей генов вокруг стартовой точки транскрипции в диапазоне ± 1000 , представленных в DRCh38/p14-сборке. Из набора ФТ, гены которых имеют повышенную транскрипционную активность в НП пациентов с БП по сравнению со ЗД, наиболее часто по сравнению с другими встречаются респонсивные элементы для ФТ *TFAP2A, TFAP2B, NEUROG2* и *FOXA2*. В литературе отсутствуют данные об участии этих ФТ в развитии БП. Однако они активно участвуют в процессах эмбрионального

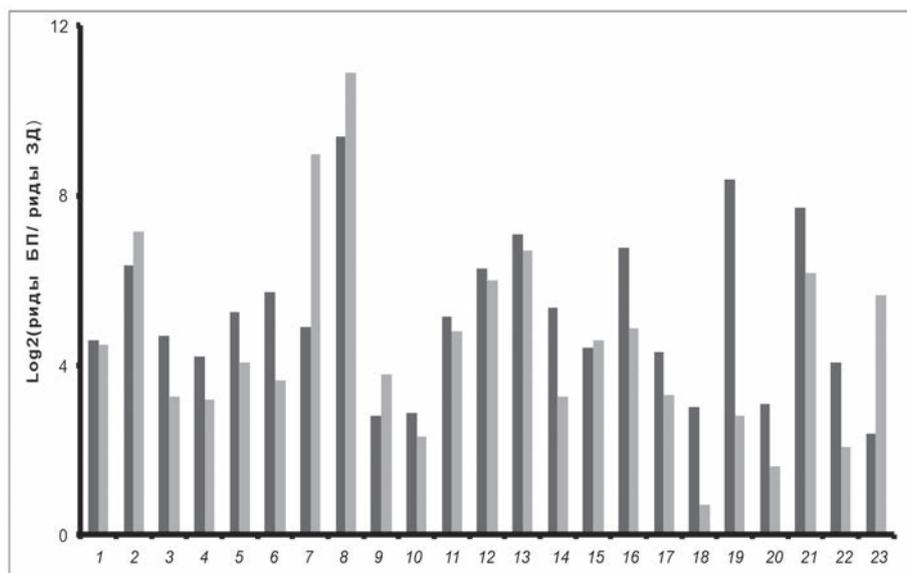


Рис. 1. ДЭГ в НП пациентов с БП по сравнению со ЗД. Данные для клеточной линии NP PDS13 по отношению к среднему значению в НП ЗД обозначены чёрным цветом, для клеточной линии NP PDS14 – серым цветом. Представлены усреднённые данные по 3 образцам РНК всех пациентов с БП и ЗД. Гены имеют обозначения: 1 – *TFAP2A*, 2 – *TFAP2B*, 3 – *PAX7*, 4 – *IRX2*, 5 – *NHLH2*, 6 – *LHX1*, 7 – *PITX1*, 8 – *PITX2*, 9 – *NEUROG1*, 10 – *NEUROG2*, 11 – *IRX3*, 12 – *IRX5*, 13 – *PCDH8*, 14 – *DLL1*, 15 – *DLL3*, 16 – *HES5*, 17 – *PTN*, 18 – *PTPRZ1*, 19 – *RALDH2*, 20 – *RALDH3*, 21 – *ASCL1*, 22 – *FRZB*, 23 – *GBX2*. Для всех генов FDR < 0,05 и Pval < 0,05, кроме гена *PTPRZ1* (NP PDS14), для которого FDR < 0,3 и Pval < 0,1

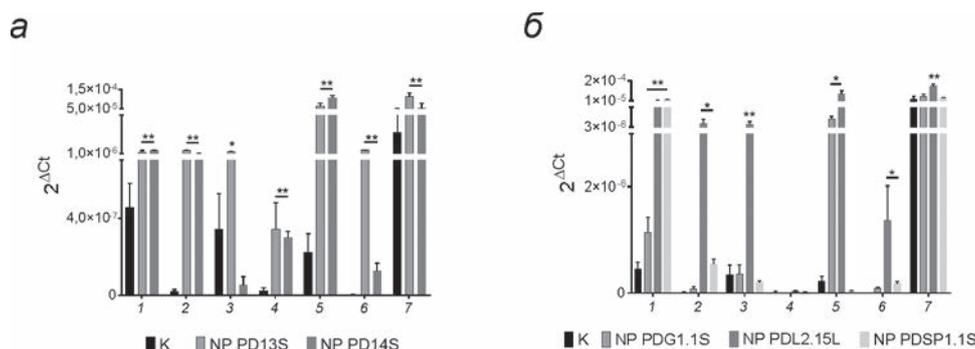


Рис. 2. ПЦР-анализ транскрипции ряда генов в линиях НП, полученных из ИПСК ЗД и пациентов с БП. *а* – НП от пациентов с БП, несущих мутации в гене *PARK2* (NP PD13S и NP PD14S); *б* – НП от пациентов с БП, несущих мутации в генах *GBA* (NP PDG1.1S), *PARK8* (NP PDL2.15L) и спорадической формой БП (NP PDSP1.1S). К – усреднённый контроль (НП трёх ЗД). В качестве референсного гена использовали ген 18S рРНК. Гены: 1 – *IRX2*, 2 – *LHX1*, 3 – *NEUROG1*, 4 – *PITX1*, 5 – *TFAP2A*, 6 – *TFAP2B*, 7 – *PTN*. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

развития нервной системы [15–17]. Полученные данные позволяют предположить, что одна из причин повышенной транскрипции генов эмбрионального развития в НП, полученных от пациентов с БП, может заключаться в аномальной повышенной экспрессии отдельных генов, кодирующих эти ФТ.

ПЦР-анализ экспрессии генов. Данные биоинформатического анализа экспрессии генов в НП, полученных из ИПСК пациентов с БП, несущих мутации в гене *PARK2* (рис. 1), в целом подтверждаются результатами анализа, проведённого с помощью ПЦР в режиме реального времени (рис. 2, *а*). Кроме того, ПЦР-анализ показал, что многие из этих генов (хотя

и не все) также повышено экспрессируются в НП, полученных от пациентов с БП, несущих мутации в генах *PARK8* и *GBA* (рис. 2, *б*).

Следовательно, повышение транскрипции многих генов, участвующих в эмбриональном развитии, в НП, полученных от пациентов с БП, по сравнению со ЗД является общим свойством при различных ассоциированных с БП мутациях.

Было также интересно установить уровни экспрессии генов, высокоэкспрессирующихся в НП, полученных от пациентов с БП, в фибробластах и недифференцированных ИПСК, полученных как от пациентов с БП, так и ЗД. ПЦР-анализ показал (рис. 3),

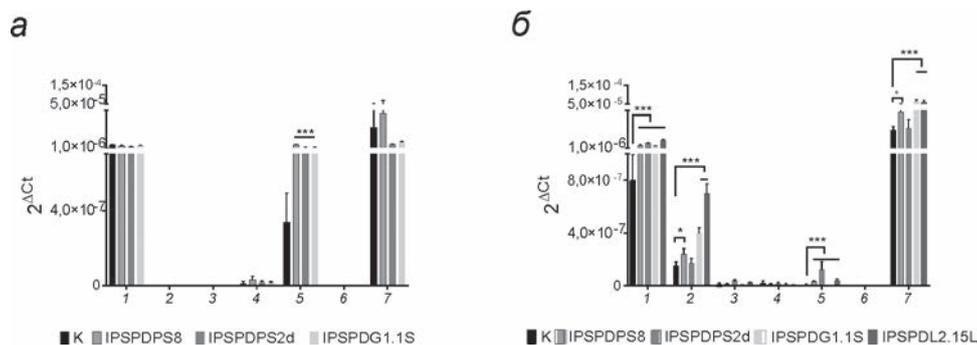


Рис. 3. ПЦР-анализ уровней транскрипции ряда генов в (а) фибробластах, полученных от пациентов с БП, и (б) ИПСК, полученных из фибробластов пациентов с БП. К – усреднённый контроль (три ЗД). В качестве референсного гена использовали ген 18S рРНК. Гены: 1 – *IRX2*, 2 – *LHX1*, 3 – *NEUROG1*, 4 – *PITX1*, 5 – *TFAP2A*, 6 – *TFAP2B*, 7 – *PTN*. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$

что уже в ИПСК, полученных от пациентов с БП, отдельные гены (*TFAP2A*, *PTN*), высокоэкспрессирующиеся в норме на эмбриональной стадии развития и в НП от пациентов с БП, усиливают свою транскрипцию по сравнению со ЗД. Сходная картина наблюдается и в фибробластах. Здесь так же, как и в ИПСК, наблюдается усиление экспрессии гена *PTN*, и дополнительно происходит усиление экспрессии генов *IRX2* и *LHX1*.

Следовательно, включение эмбриональной программы транскрипции генов при мутациях в гене *PARK2* частично отражается в транскрипционной подпериодической уже на стадии фибробластов, использованных для получения ИПСК. Функционирует она частично и в ИПСК. Вместе с тем в НП, полученных из ИПСК от пациентов с БП, эта программа находится своё дальнейшее развитие.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Наше понимание патологических механизмов, лежащих в основе БП, во многом зависит от моделей, используемых для её изучения, которые порой не в полной мере отражают сложность патологии или клеточный состав человеческого мозга. Так, модели животных, основанные на воздействии токсинов, часто неспособны адекватно отразить критические аспекты БП человека и не в полной мере воспроизводят фенотипы заболевания [18]. Посмертные ткани мозга пациентов с БП, как правило, малодоступны и демонстрируют лишь позднюю стадию прогрессирования заболевания. Открытие методологии получения ИПСК позволило преодолеть это препятствие и обеспечило доступ к нервным клеткам человеческого происхождения для моделирования изогенных заболеваний [19].

Использование недифференцированных ИПСК, полученных из фибробластов пациентов с БП, позволяет воспроизводить на их основе в достаточных для исследований количествах нервные клетки, находящиеся на разных этапах дифференцировки. Мы использовали этот широко распространённый подход для получения и последующего сравнительного анализа транскриптомов НП, дифференцированных из ИПСК от пациентов с БП и ЗД.

Ранее нами было показано, что в нейральных клетках-предшественниках, полученных из ИПСК от пациентов с БП, наблюдается повышенная транскрипция кластеров генов *HOX* по сравнению со ЗД [8]. Эти гены в норме активно экспрессируются на ранних стадиях эмбрионального развития, а в клетках взрослого организма их экспрессия практически полностью выключается. Для выяснения уровней транскрипции других специфичных для эмбриональных стадий развития генов в НП, полученных от пациентов с БП, в настоящей работе проведён дополнительный биоинформатический анализ. Был установлен большой набор кодирующих белки ДЭГ в клетках НП, которые, как и ранее обнаруженные *HOX*-гены, также повышено транскрибируются у пациентов с БП, но имеют очень низкие уровни транскрипции в НП ЗД.

Так, к повышено-транскрибирующимся генам в НП от пациентов с БП по сравнению со ЗД, обнаруженным в настоящей работе (рис. 1), относится ген плеiotрофина (*PTN*). Ген *PTPRZ1*, кодирующий рецептор *PTN*, также имеет повышенный уровень экспрессии. Ранее было показано [20], что гены семейства, к которым принадлежит *PTN* и их рецепторы, имеют высокую экспрессию в стриатуме и в чёрной субстанции мозга в процессе эмбрионального развития и играют важную роль в развитии ДА системы в норме и при дегенерации

у пациентов с БП [21]. *PTN* является естественным участником развития и реакции на повреждение в этой системе и может быть мишенью для использования в терапии для защиты или реконструкции нигростриального сегмента при БП.

Среди генов, повышенно-транскрибирующихся в НП пациентов с БП, выявлены гены (*DLL1* и *HES5*), имеющие отношение к работе сигнальной системы NOTCH, которая также является ключевой в морфогенезе мозга. Ранее отмечалось, что этот сигнальный путь имеет значительное обогащение по ДЭГ в чёрной субстанции мозга при БП [22]. Каноническим лигандом NOTCH-системы, запускающим сигнальный процесс, является белковый рецептор *DLL1*, эффектором которого служит ген *HES5*. Существуют данные о том, что *HES5* регулирует время перехода между фазами спецификации неокортикальных нейронов, а также между нейрогенезом и глиогенезом [23]. Известно, что повышенная экспрессия *HES5* приводит к подавлению экспрессии генов *HMGAI1*, 2, что существенно для компетенции нейральных стволовых клеток [23]. Ген *DLL3* также является компонентом NOTCH-системы и служит её ингибитором [24]. В промоторной области он содержит много регуляторных элементов, которые делают его мишенью для белков, кодируемых высокотранскрибируемыми генами *ASCL1* [25] и *NEUROG1*, 2 [26]. Ранее установлено, что ген *ASCL1* повышенно экспрессируется в нейральных стволовых клетках [27] и является маркером БП [28–30].

Обращает на себя внимание повышенная транскрипция генов нейроспецифических транскрипционных факторов *NEUROG1* и 2. Известно, что повышенная экспрессия этих генов в человеческих стволовых клетках приводит к появлению сети возбуждающих и ингибирующих нейронов [31]. *NEUROG1* служит также негативным регулятором развития неокортекса [32]. Установлено, что ген *NEUROG2* необходим для развития ДА нейронов среднего мозга [33]. Показано также, что искусственное повышение транскрипции *NEUROG1* в ИПСК приводит к повышению транскрипции *HOX*-генов всех 4 кластеров в производных нейронах [34], что мы наблюдали ранее в НП пациентов с БП [8]. Важно также отметить, что проведённый нами биоинформатический анализ указывает на то, что многие гены, которые имеют повышенную транскрипционную активность в НП от пациентов с БП по сравнению со ЗД, наиболее часто содержат репрессивные элементы, характерные для гена *NEUROG2*.

Повышенно-транскрибирующиеся в НП пациентов с БП гены *NHLH1* и 2 кодируют факторы транскрипции, экспрессия которых ограничена нервной системой и которые играют важную роль в дифференцировке нейронов [35–37].

Повышенный уровень транскрипции в НП от пациентов с БП имеют также гены *PITX1*, *PITX2*, *PAX3*, 7, *MYOD* (*MDF1*). ФТ *PITX1* регулирует экспрессию многих генов развития, включая гены, участвующие в ранних стадиях развития мозга [38]. Гены *PAX3*, 7 на ранних стадиях развития служат триггерами при формировании границы между средним и задним мозгом и регионализации тектума [39–41]. *PAX3* также является опорным модулятором миграции клеток нейронального гребня при эмбриогенезе [42].

Трансмембранный белок, кодируемый геном *PCDH8*, который повышенно экспрессируется в НП, полученных от пациентов с БП, также влияет на дифференцировку нейронов во время эмбрионального развития [43]. Было также установлено, что ген *PCDH8* в значительной степени связан с патологическими процессами, происходящими при БП, представляя собой потенциально новый биомаркер БП или терапевтическую мишень [44, 45].

Во время раннего нейрогенеза важную роль играет ретиноевая кислота (РК), синтез которой среди прочих определяется генами *RADLH2* и *RADLH3* [46, 47]. Высокая транскрипция этих генов, обнаруженная нами в НП, полученных от пациентов с БП (рис. 1), может приводить к повышению содержания РК в клетках выше нормы и тем самым оказывать влияние на их фенотип. На это указывают многочисленные данные об аномальном влиянии РК на процессы развития [48, 49]. РК контролирует экспрессию гена *GBX2* [50–53], который имеет высокий уровень транскрипции в НП, полученных от пациентов с БП, и низкий – в НП от ЗД. Имеются многочисленные указания на то, что этот ген играет важную роль в развитии центральной нервной системы. Он участвует в подавлении экспрессии гена *OTX2* [50–52], который, в свою очередь, влияет на экспрессию гена *LMX1A*. Эта группа генов участвует в судьбе нейральных предшественников и/или нейрогенезе ДА нейронов в значительной степени опосредованно через сигнальный путь WNT, в частности *WNT1* [33, 54, 55]. По нашим данным, экспрессия генов *WNT1*, *FGF8*, *OTX2* и *LMX1A* существенно понижена в НП пациентов с БП по сравнению со ЗД, тогда как повышенный уровень экспрессии *FRZB*, ингибитора сигнального

пути WNT [54, 56, 57], и гена *GBX2* выявлен у пациентов с БП по сравнению со ЗД. По данным литературы, продукты этих генов при нормальном развитии без патологий взаимодействуют с компонентами сигнального пути WNT, модулируя их сигналы [58–60]. Можно предположить, что при мутантных вариантах генов *PARK2* возможны изменения всей структуры WNT-пути, приводящие к аномалиям в нейрогенезе ДА нейронов.

У пациентов с БП по сравнению со ЗД на этапе НП наблюдается также повышенный уровень транскрипции генов *TFAP2A* и *TFAP2B*. Известно, что транскрипционный фактор, кодируемый *TFAP2A*, в составе гетеродимера с *TFAP2B* участвует в нейруляции на отдельных стадиях развития нервного гребня и необходим для индукции границы нервной пластинки и спецификации клеток нервного гребня [61, 62]. Упомянутый выше ген *FRZB*, отрицательно влияющий на нейрогенез ДА нейронов при высокой активности, имеет в промоторной зоне несколько сайтов связывания ФТ *TFAP2A* и *TFAP2B*, с чем может быть связан его высокий уровень транскрипции. Как показано нами выше с помощью биоинформатического анализа, многие гены, которые имеют повышенную транскрипционную активность в НП пациентов с БП по сравнению со ЗД, часто содержат репрессивные элементы также для этих двух ФТ.

В нормальном нейрогенезе участвует также гомеобокс-содержащий ген *IRX2* [63], который повышенно экспрессируется в НП, полученных из ИПСК от пациентов с БП. Ранее уже имелись указания на то, что повышенная транскрипция этого гена может быть биомаркером БП [64].

Следует также обратить внимание на повышенный уровень транскрипции некоторых из исследуемых «эмбриональных» генов в фибробластах и недифференцированных ИПСК от пациентов с БП. Эти результаты показывают, что у пациентов с БП изменение транскрипционного профиля частично происходит не только в НП, но и в других типах клеток.

Таким образом, в НП, полученных из ИПСК пациентов с БП, наблюдается повышенная транскрипция многих генов, активно экспрессирующихся в норме на эмбриональных стадиях развития нервной системы человека. Важно, что все эти гены слабо или вообще не транскрибируются в НП, полученных из ИПСК трёх ЗД. Следовательно, «эмбриональные» гены, активно экспрессирующиеся в НП, полученных от пациентов с БП, не требуются для нормального функционирования нейральных клеток. Наблюдаемый процесс можно на-

звать дематурацией НП при БП. Термин «дематурация» был использован ранее при изучении транскриптома нейральных клеток гиппокампа и префронтальной коры после воздействия антидепрессантом флуоксетином [65, 66]. Кроме того, существует предположение, что гены, которые функционируют в основном на ранних стадиях эмбриогенеза в головном мозге, могут быть активированы десятилетиями позже (например, в результате воспаления или вирусной инфекции) и разрушать своим действием те же нервные структуры, которые они создали при внутриутробном развитии [67]. Существует также ряд косвенных указаний на то, что механизмы, приводящие к дедифференцировке (дематурации) и подавлению идентичности зрелых нейронов, способствуют нейродегенерации [68]. Вместе с тем нельзя исключить, что наблюдаемая нами картина экспрессии генов в НП пациентов с БП может быть также результатом обратного процесса – имматурации (задержки дифференцировки).

На основании полученных данных можно заключить, что в НП, полученных от пациентов с БП, по сравнению с НП ЗД происходит изменение транскриптома, которое выражается в значительном повышении экспрессии ряда генов, в норме принимающих участие в эмбриональном развитии и прекращающих экспрессироваться во взрослом организме.

Хотя полученные результаты дают принципиально новый взгляд на механизмы развития БП, следует отметить некоторые проблемы, связанные с использованным нами подходом. Во-первых, эксперименты проводились на модели *in vitro*, которая имеет определённые ограничения [69]. Во-вторых, число «эмбриональных» генов, проанализированных нами с помощью биоинформатического анализа и верифицированных с использованием ПЦР, достаточно ограничено и не включает всю «панель» таких генов. Тем не менее общая тенденция значительного повышения уровня транскрипции «эмбриональных» генов в НП от пациентов с БП по сравнению со ЗД представляется очевидной. В дальнейшем планируется исследовать экспрессию наиболее интересных генов на белковом уровне.

Вклад авторов. Все авторы внесли свой вклад в разработку концепции и дизайна исследования. Подготовку материала осуществляли Новосадова Е.В. и Ненашева В.В. Сбор и анализ данных были выполнены Новосадовой Е.В., Новосадовой Л.В., Ненашевой В.В., Гривениковым И.А. и Федосеевой В.Б. Первый черновик рукописи был написан Федосеевой В.Б.

и Тарантулом В.З. Все авторы прочитали и одобрили окончательную рукопись.

Финансирование. Работа была поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-1357) (получение клеточных линий) и Российским научным фондом (проект № 21-15-00103) (биоинформатический анализ).

Благодарности. Авторы выражают благодарность академику Иллариошкину С.Н. (Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии») за предоставленный биопсийный материал пациентов с БП, проф. М.А. Лагарковой (Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального

медико-биологического агентства) за предоставление части линий ИПСК. Исследование проводилось с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Центр клеточных и геновых технологий» Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, Россия.

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. Описание клеточных линий, полученных от людей с их согласия, содержится в предыдущих статьях, где они впервые упоминаются.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- De Lau, L. M., and Breteler, M. M. B. (2006) Epidemiology of Parkinson's disease, *Lancet Neurol.*, **5**, 525-535, doi: 10.1016/S1474-4422(06)70471-9.
- Okano, H., and Yamanaka, S. (2014) iPS cell technologies: significance and applications to CNS regeneration and disease, *Mol. Brain*, **7**, 22, doi: 10.1186/1756-6606-7-22.
- Day, J. O., and Mullin, S. (2021) The genetics of Parkinson's disease and implications for clinical practice, *Genes (Basel)*, **12**, 1006, doi: 10.3390/genes12071006.
- Rathore, A. S., Birla, H., Singh, S. S., Zahra, W., Dilmashin, H., Singh, R., Keshri, P. K., and Singh, S. P. (2021) Epigenetic modulation in Parkinson's disease and potential treatment therapies, *Neurochem. Res.*, **46**, 1618-1626, doi: 10.1007/s11064-021-03334-w.
- Rouaud, T., Corbillé, A.-G., Leclair-Visonneau, L., de Lataillade, A. G., Lionnet, A., Preterre, C., Damier, P., and Derkinderen, P. (2021) Pathophysiology of Parkinson's disease: mitochondria, alpha-synuclein and much more, *Rev. Neurol. (Paris)*, **177**, 260-271, doi: 10.1016/j.neurol.2020.07.016.
- Novosadova, E.V., Grivennikov, I.A. Induced pluripotent stem cells: From derivation to application in biochemical and biomedical research. *Biochemistry (Moscow)*, **79**, 1425-1441, doi: 10.1134/S000629791413001X.
- Новосадова Е. В., Некрасов Е. Д., Честков И. В., Сурдина А. В., Васина Е. М., Богомазова А. Н., Мануилова Е. С., Арсеньева Е. Л., Симонова В. В., Коновалова Е. В., Федотова Е. Ю., Абрамичева Н. Ю., Хаспеков Л. Г., Гривенников И. А., Тарантул В. З., Киселев С. Л., Иллариошкин С. Н. (2016) Платформа для изучения молекулярных и клеточных механизмов болезни Паркинсона, основанная на индуцированных плюрипотентных стволовых клетках, *Совр. Технол. Мед.*, **8**, 157-166, doi: 10.17691/stm2016.8.4.20.
- Fedoseeva, V. B., Novosadova, E. V., Novosadova, V. V., Nenasheva, V. V., Grivennikov, I. A., and Tarantul, V. Z. (2022) The level of transcription of HOX genes increased in neural precursors derived from iPSC from patients with Parkinson's disease, In *Smart and Innovative Farming for Sustainable Agriculture and Food Systems*, Springer Nature.
- Novosadova, E., Anufrieva, K., Kazantseva, E., Arsenyeva, E., Fedoseyeva, V., Stepanenko, E., Poberezhniy, D., Illarioshkin, S., Novosadova, L., Gerasimova, T., Nenasheva, V., Grivennikov, I., Lagarkova, M., and Tarantul, V. (2022) Transcriptome datasets of neural progenitors and neurons differentiated from induced pluripotent stem cells of healthy donors and Parkinson's disease patients with mutations in the PARK2 gene, *Data Brief*, **41**, 107958, doi: 10.1016/j.dib.2022.107958.
- Avazzadeh, S., Baena, J. M., Keighron, C., Feller-Sanchez, Y., and Quinlan, L. R. (2021) Modeling Parkinson's disease: iPSCs towards better understanding of human pathology, *Brain Sci.*, **11**, 373, doi: 10.3390/brainsci11030373.
- Novosadova, E. V., Nenasheva, V. V., Makarova, I. V., Dolotov, O. V., Inozemtseva, L. S., Arsenyeva, E. L., Chernyshenko, S. V., Sultanov, R. I., Illarioshkin, S. N., Grivennikov, I. A., and Tarantul, V. Z. (2020) Parkinson's disease-associated changes in the expression of neurotrophic factors and their receptors upon neuronal differentiation of human induced pluripotent stem cells, *J. Mol. Neurosci.*, **70**, 514-521, doi: 10.1007/s12031-019-01450-5.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., and Smyth, G. K. (2010) EdgeR: a Bioconductor package for differential

- expression analysis of digital gene expression data, *Bioinformatics*, **26**, 139-140, doi: 10.1093/bioinformatics/btp616.
13. Livak, K., and Schmittgen, T. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method, *Methods*, **25**, 402-408, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
 14. Kulakovskiy, I. V., Vorontsov, I. E., Yevshin, I. S., Sharipov, R. N., Fedorova, A. D., Rumynskiy, E. I., Medvedeva, Y. A., Magana-Mora, A., Bajic, V. B., Papatsenko, D. A., Kolpakov, F. A., and Makeev, V. J. (2018) HOCOMOCO: towards a complete collection of transcription factor binding models for human and mouse via large-scale ChIP-Seq analysis, *Nucleic Acids Res.*, **46(D1)**, D252-D259, doi: 10.1093/nar/gkx1106.
 15. Wang, W. D., Melville, D. B., Montero-Balaguer, M., Hatzipoulos, A. K., and Knapik, E. W. (2011) Tfp2a and Foxd3 regulate early steps in the development of the neural crest progenitor population, *Dev. Biol.*, **360**, 173-185, doi: 10.1016/j.ydbio.2011.09.0194.
 16. Hulme, A. J., Maksour, S., St-Clair Glover, M., Mielliet, S., and Dottori, M. (2022) Making neurons, made easy: the use of neurogenin-2 in neuronal differentiation, *Stem Cell Rep.*, **17**, 14-34, doi: 10.1016/j.stemcr.2021.11.015.
 17. Ang, S-L. (2009) Foxa1 and Foxa2 transcription factors regulate differentiation of midbrain dopaminergic neurons, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **651**, 58-65, doi: 10.1007/978-1-4419-0322-8_5.
 18. Blesa, J., and Przedborski, S. (2014) Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability, *Front. Neuroanat.*, **8**, 155-167, doi: 10.3389/fnana.2014.00155.
 19. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell*, **126**, 663-676, doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.
 20. Marchionini, M., Lehrmann, E., Chu, Y., He, B., Sorwell, C. E., Beckerc, K. G., Freed, W. J., Kordower, J. H., and Collier, T. J. (2007) Role of heparin binding growth factors in nigrostriatal dopamine system development and Parkinson's disease, *Brain Res.*, **1147**, 77-88, doi: 10.1016/j.brainres.2007.02.028.
 21. Zagare, A., Barmpha, K., Smajic, S., Smits, L. M., Grzyb, K., Grünewald, A., Skupin, A., Nickels, S. L., and Schwamborn, J. C. (2022) Midbrain organoids mimic early embryonic neurodevelopment and recapitulate LRRK2-p.Gly2019Ser-associated gene expression, *Am. J. Hum. Genet.*, **109**, 311-327, doi: 10.1016/j.ajhg.2021.12.009.
 22. Wang, Y., and Wang, Z. (2020) An integrated network analysis of mRNA and gene expression profiles in Parkinson's disease, *Med. Sci. Monit.*, **26**, 920846, doi: 10.12659/msm.920846.
 23. Bansod, S., Kageyama, R., and Ohtsuka, T. (2017) HES5 regulates the transition timing of neurogenesis and gliogenesis in mammalian neocortical development, *Development*, **144**, 3156-3167, doi: 10.1242/dev.147256.
 24. Chapman, G., Sparrow, D. B., Kremmer, E., and Dunwoodie, S. L. (2011) Notch inhibition by the ligand DELTA-LIKE 3 defines the mechanism of abnormal vertebral segmentation in spondylocostal dysostosis, *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 905-916, doi: 10.1093/hmg/ddq529.
 25. Augustyn, A., Borromeo, M., Wang, T., Fujimoto, J., Shao, C., Dospoy, P. D., Lee, V., Tan, C., Sullivan, J. P., Larsen, J. E., Girard, L., Behrens, C., Wistuba, I. I., Xie, Y., Cobb, M. H., Gazdar, A. F., Johnson, J. E., and Minna, J. D. (2014) ASCL1 is a lineage oncogene providing therapeutic targets for high-grade neuroendocrine lung cancers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 14788-14793, doi: 10.1073/pnas.1410419111.
 26. Henke, R. M., Meredith, D. M., Borromeo, M. D., Savage, T. K., and Johnson, J. E. (2009) Ascl1 and Neurog2 form novel complexes and regulate Delta-like3 (Dll3) expression in the neural tube, *Dev. Biol.*, **328**, 529-540, doi: 10.1016/j.ydbio.2009.01.007.
 27. Kageyama, R., Shimojo, H., and Ohtsuka, T. (2019) Dynamic control of neural stem cells by bHLH factors, *Neurosci. Res.*, **138**, 12-18, doi: 10.1016/j.neures.2018.09.005.
 28. Ide, M., Yamada, K., Toyota, T., Iwayama, Y., Ishitsuka, Y., Minabe, Y., Nakamura, K., Hattori, N., Asada, T., Mizuno, Y., Mori, N., and Yoshikawa, T. (2005) Genetic association analyses of PHOX2B and ASCL1 in neuropsychiatric disorders: evidence for association of ASCL1 with Parkinson's disease, *Hum. Genet.*, **117**, 520-527, doi: 10.1007/s00439-005-1342-8.
 29. Oliveira, M. A. P., Balling, R., Smidt, M. P., and Fleming, R. M. T. (2017) Embryonic development of selectively vulnerable neurons in Parkinson's disease, *NPJ Parkinson Dis.*, **3**, 21, doi: 10.1038/s41531-017-0022-4.
 30. Caiazzo, M., Dell'Anno, M. T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., Sotnikova, T. D., Menegon, A., Roncaglia, P., Colciago, G., Russo, G., Carninci, P., Pezzoli, G., Gainetdinov, R. R., Gustincich, S., Dityatev, A., and Broccoli, V. (2011) Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts, *Nature*, **476**, 224-227, doi: 10.1038/nature10284.
 31. Lu, C., Shi, X., Allen, A., Baez-Nieto, D., Nikish, A., Sanjana, N. E., and Pan, J. Q. (2019) Overexpression of NEUROG2 and NEUROG1 in human embryonic stem cells produces a network of excitatory and inhibitory neurons, *FASEB J.*, **33**, 5287-5299, doi: 10.1096/fj.201801110RR.
 32. Han, S., Dennis, D. F., Balakrishnan, A., Dixit, R., Britz, O., Zinyk, D., Touahri, Y., Olender, T., Brand, M., Guillemot, F., Kurrasch, D., and Schuurmans, C. (2018) A non-canonical role for the proneural gene *Neurog1* as a negative regulator

- of neocortical neurogenesis, *Development*, **145**, dev157719, doi: 10.1242/dev.157719.
33. Kele, J., Simplicio, N., Ferri, A. L. M., Mira, H., Guillemot, F., Arenas, E., and Ang, S.-L. (2006) Neurogenin 2 is required for the development of ventral midbrain dopaminergic neurons, *Development*, **133**, 495-505, doi: 10.1242/dev.02223.
 34. Dasen, J. S., Tice, B. C., Brenner-Morton, S., and Jessell, T. M. (2005) A Hox regulatory network establishes motor neuron pool identity and target-muscle connectivity, *Cell*, **123**, 477-491, doi: 10.1016/j.cell.2005.09.009.
 35. Schmid, T., Krüger, M., and Braun, T. (2007) NSCL-1 and -2 control the formation of precerebellar nuclei by orchestrating the migration of neuronal precursor cells, *Neurochemistry*, **102**, 2061-2072, doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04694.x.
 36. Kratochwil, C. F., Maheshwari, U., and Rijli, F. M. (2017) The long journey of pontine nuclei neurons: from rhombic lip to cortico-ponto-cerebellar circuitry, *Front. Neurol. Circuits*, **11**, 33, doi: 10.3389/fncir.2017.00033.
 37. Krüger, M., Ruschke, K., and Braun, T. (2004) NSCL-1 and NSCL-2 synergistically determine the fate of GnRH-1 neurons and control necdin gene expression, *EMBO J.*, **23**, 4353-4364, doi: 10.1038/sj.emboj.7600431.
 38. Byun, J. S., Oh, M., Lee, S., Gil, J.-E., Mo, Y., Ku, B., Kim, W. K., Oh, K. J., Lee, E. W., Bae, K. H., Lee, S. C., and Han, B. S. (2020) The transcription factor PITX1 drives astrocyte differentiation by regulating the SOX9 gene, *J. Biol. Chem.*, **295**, 13677-13690, doi: 10.1074/jbc.RA120.013352.
 39. Agoston, Z., Li, N., Haslinger, A., Wizenmann, A., and Schulte, D. (2012) Genetic and physical interaction of Meis2, Pax3 and Pax7 during dorsal midbrain development, *BMC Dev. Biol.*, **12**, 10, doi: 10.1186/1471-213X-12-10.
 40. Mansouri, A. (1998) The role of Pax3 and Pax7 in development and cancer, *Crit. Rev. Oncog.*, **9**, 141-149, doi: 10.1615/critrevoncog.v9.i2.40.
 41. Agoston, Z., and Schulte, D. (2009) Meis2 competes with the Groucho co-repressor Tle4 for binding to Otx2 and specifies tectal fate without induction of a secondary midbrain-hindbrain boundary organizer, *Development*, **136**, 3311-3322, doi: 10.1242/dev.037770.
 42. Xu, M., Li, Y., Du, J., Lin, H., Cao, S., Mao, Z., Wu, R., Liu, M., Liu, Y., and Yin, Q. (2018) PAX3 promotes cell migration and CXCR4 gene expression in neural crest cells, *J. Mol. Neurosci.*, **64**, 1-8, doi: 10.1007/s12031-017-0995-9.
 43. Green, Y. S., and Vetter, M. L. (2021) EBF factors drive expression of multiple classes of target genes governing neuronal development, *Neural. Dev.*, **6**, 19, doi: 10.1186/1749-8104-6-19.
 44. Chandrasekaran, S., and Bonchev, D. (2013) A network view on Parkinson's disease, *Comput. Struct. Biotechnol.*, **7**, 201304004, doi: 10.5936/csbj.201304004.
 45. Cruz-Monteagudo, M., Borges, F., Paz-Y-Miño, C., Cordeiro, M. N. D. S., Rebelo, I., Perez-Castillo, Y., Helguera, A. M., Sánchez-Rodríguez, A., and Tejera, E. (2016) Efficient and biologically relevant consensus strategy for Parkinson's disease gene prioritization, *BMC Med. Genomics*, **9**, 12, doi: 10.1186/s12920-016-0173-x.
 46. Maden, M. (2007) Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system, *Nat. Rev. Neurosci.*, **8**, 755-765, doi: 10.1038/nrn2212.
 47. Napoli, J. L. (2012) Physiological insights into all-trans-retinoic acid biosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1821**, 152-167, doi: 10.1016/j.bbali.2011.05.004.
 48. Yamamoto, M., Zhang, J., Smith, D., Hayakawa, Y., and McCaffery, P. (2003) A critical period for retinoic acid teratogenesis and loss of neurophilic migration of pontine nuclei neurons, *Mech. Dev.*, **120**, 701-709, doi: 10.1016/s0925-4773(03)00047-9.
 49. Yamamoto, M., Fujinuma, M., Hirano, S., Hayakawa, Y., Clagett-Dame, M., Zhang, J., and McCaffery, P. (2005) Retinoic acid influences the development of the inferior olivary nucleus in the rodent, *Dev. Biol.*, **280**, 421-433, doi: 10.1016/j.ydbio.2005.02.007.
 50. Bouillet, P., Chazaud, C., Oulad-Abdelghani, M., Dollé, P., and Chambon, P. (1995) Sequence and expression pattern of the Stra7 (Gbx-2) homeobox-containing gene induced by retinoic acid in P19 embryonal carcinoma cells, *Dev. Dyn.*, **204**, 372-382, doi: 10.1002/aja.1002040404.
 51. Wassarman, K. M., Lewandoski, M., Campbell, K., Joyner, A. L., Rubenstein, J. L., Martinez, S., and Martin, G. R. (1997) Specification of the anterior hindbrain and establishment of a normal mid/hindbrain organizer is dependent on Gbx2 gene function, *Development*, **124**, 2923-2934, doi: 10.1242/dev.124.15.2923.
 52. Millet, S., Campbell, K., Epstein, D. J., Losos, K., Harris, E., and Joyner, A. (1999) A role for Gbx2 in repression of Otx2 and positioning the mid/hindbrain organizer, *Nature*, **401**, 161-164, doi: 10.1038/43664.
 53. Mesman, S., and Smidt, M. P. (2020) Acquisition of the midbrain dopaminergic neuronal identity, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4638, doi: 10.3390/ijms21134638.
 54. Prakash, N., Brodski, C., Naserke, T., Puelles, E., Gogoi, R., Hall, A., Panhuysen, M., Echevarria, D., Sussel, L., Weisenhorn, D. M., Martinez, S., Arenas, E., Simeone, A., and Wurst, W. (2006) A Wnt1-regulated genetic network controls the identity and fate of midbrain-dopaminergic progenitors *in vivo*, *Development*, **133**, 89-98, doi: 10.1242/dev.02181.
 55. Yang, J., Brown, A., Ellisor, D., Paul, E., Hagan, N., and Zervas, M. (2013) Dynamic temporal requirement of Wnt1 in midbrain dopamine neuron development, *Development*, **140**, 1342-1352, doi: 10.1242/dev.080630.

56. Arenas, E. (2014) Wnt signaling in midbrain dopaminergic neuron development and regenerative medicine for Parkinson's disease, *J. Mol. Cell. Biol.*, **6**, 42-53, doi: 10.1093/jmcb/mju001.
57. Akane, H., Saito, F., Shiraki, A., Imatanaka, N., Akahori, Y., Itahashi, M., Wang, L., and Shibutani, M. J. (2014) Gene expression profile of brain regions reflecting aberrations in nervous system development targeting the process of neurite extension of rat offspring exposed developmentally to glycidol, *Appl. Toxicol.*, **34**, 1389-1399, doi: 10.1002/jat.2971.
58. Rawal, N., Corti, O., Sacchetti, P., Ardilla-Osorio, H., Sehat, B., Brice, A., and Arenas, E. (2009) Parkin protects dopaminergic neurons from excessive Wnt/beta-catenin signaling, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **388**, 473-478, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.07.014.
59. Sancho, R. M., Law, B. M. H., and Harvey, K. (2009) Mutations in the LRRK2 Roc-COR tandem domain link Parkinson's disease to Wnt signaling pathways, *Hum. Mol. Genet.*, **18**, 3955-3968, doi: 10.1093/hmg/ddp337.
60. Berwick, D. C., and Harvey, K. (2012) LRRK2 functions as a Wnt signaling scaffold, bridging cytosolic proteins and membrane-localized LRP6, *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 4966-4979, doi: 10.1093/hmg/ddc342.
61. Rothstein, M., and Simoes-Costa, M. (2020) Heterodimerization of TFAP2 pioneer factors drives epigenomic remodeling during neural crest specification, *Genome Res.*, **30**, 35-48, doi: 10.1101/gr.249680.119.
62. Kousa, Y. A., Zhu, H., Fakhouri, W. D., Lei, Y., Kinoshita, A., Roushangar, R. R., Patel, N. K., Agopian, A. J., Yang, W., Leslie, E. J., Busch, T. D., Mansour, T. A., Li, X., Smith, A. L., Li, E. B., Sharma, D. B., Williams, T. J., Chai, Y., Amendt, B. A., Liao, E. C., Mitchell, L. E., Bassuk, A. G., Gregory, S., Ashley-Koch, A., Shaw, G. M., Finnell, R. H., and Schutte, B. C. (2019) *TFAP2A-IRF6-GRHL* genetic pathway is conserved in neurulation, *Hum. Mol. Genet.*, **28**, 1726-1737, doi: 10.1093/hmg/ddz010.
63. Ahn, J.-I., Lee, K.-H., Shin, D.-M., Shim, J.-W., Lee, J.-S., Chang, S.Y., Lee, Y.-S., Brownstein, M. J., Lee, S.-H., and Lee, Y.-S. (2004) Comprehensive transcriptome analysis of differentiation of embryonic stem cells into midbrain and hindbrain neurons, *Dev. Biol.*, **265**, 491-501, doi: 10.1016/j.ydbio.2003.09.041.
64. Sim, H., Lee, J.-E., Yoo, H. M., Cho, S., Lee, H., Baek, A., Kim, J., Seo, H., Kweon, M. N., Kim, H. G., Jeon, Y. J., Son, M. Y., and Kim, J. (2020) Iroquois homeobox protein 2 identified as a potential biomarker for Parkinson's disease, *Int. J. mol. Sci.*, **21**, 3455, doi: 10.3390/ijms21103455.
65. Hagihara, H., Ohira, K., and Miyakawa, T. (2019) Transcriptomic evidence for immaturity induced by antidepressant fluoxetine in the hippocampus and prefrontal cortex, *Neuropsychopharmacol. Rep.*, **39**, 78-89, doi: 10.1002/npr2.12048.
66. Hagihara, H., Murano, T., Ohira, K., Miwa, M., Nakamura, K., and Miyakawa, T. (2019) Expression of progenitor cell/immature neuron markers does not present definitive evidence for adult neurogenesis, *Mol. Brain*, **12**, 108, doi: 10.1186/s13041-019-0522-8.
67. Lehrer, S., and Rheinstein, P. H. (2021) Alzheimer's disease and Parkinson's disease may result from reactivation of embryologic pathways silenced at birth, *Discov. Med.*, **31**, 89-94.
68. Caldwell, A. B., Liu, Q., Schroth, G. P., Galasko, D. R., Yuan, S. H., Wagner, S. T., and Subramaniam, S. (2020) Dedifferentiation and neuronal repression define familial Alzheimer's disease, *Sci. Adv.*, **6**, eaba5933, doi: 10.1126/sciadv.aba5933.
69. Weykopf, B., Haupt, S., Jungverdorben, J., Flitsch, L. J., Hebisch, M., Liu, G.-H., Suzuki, K., Belmonte, J. C. I., Peitz, M., Blaess, S., Till, A., and Brüstle, O. (2019) Induced pluripotent stem cell-based modeling of mutant LRRK2-associated Parkinson's disease, *Eur. J. Neurosci.*, **49**, 561-589, doi: 10.1111/ejn.14345.

ACTIVATION OF EMBRYONIC GENE TRANSCRIPTION IN NEURAL PRECURSOR CELLS DERIVED FROM INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS OF PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE

**V. B. Fedoseyeva*^{#,} E. V. Novosadova[#], V. V. Nenasheva[#], L. V. Novosadova,
I. A. Grivennikov, and V. Z. Tarantul**

National Research Center "Kurchatov Institute", 123182 Moscow, Russia; e-mail: fvb@img.msk.ru

Parkinson's disease (PD) is one of the most common neurodegenerative diseases in the world. Despite numerous studies, the causes of this pathology remain completely unknown. This is, among other things, due to the difficulty of obtaining biological material for analysis. Neural cell cultures derived from induced

pluripotent stem cells (iPSCs) serve as a great potential for studying the molecular events underlying the pathogenesis of PD. This paper presents the results of bioinformatic analysis of data obtained using RNA-seq technology in the study of neural precursors (NP) obtained from iPSCs of healthy donors and patients with PD carrying various mutations that are a common cause of familial PD. This analysis showed that in NP cells obtained from PD patients, unlike healthy donors, the level of transcription of genes actively expressed in the nervous system at the embryonic stage of development was significantly increased. Bioinformatic data are generally confirmed by real-time PCR. The data obtained suggest that one of the causes of PD may be an abnormal process of enhancing the expression of embryonic genes during differentiation of neural cells (dematuration).

Keywords: Parkinson's disease, induced pluripotent stem cells, neural precursors, RNA-seq, differentiation gene expression, PCR, bioinformatic analysis

ОСТРЫЙ И ХРОНИЧЕСКИЙ ЛИПОПОЛИСАХАРИДНЫЙ СТРЕСС РЕГИОН-СПЕЦИФИЧНО ИЗМЕНЯЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В МОЗГЕ КРЫС И ВЛИЯЕТ НА ОБУЧЕНИЕ И ПАМЯТЬ В ВОДНОМ ЛАБИРИНТЕ МОРРИСА

© 2023 М.И. Зайченко*, П. Филенко, В. Сидорина, Г.А. Григорьян

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
117485 Москва, Россия; электронная почта: mariya-zajchenko@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.10.2022

После доработки 11.03.2023

Принята к публикации 11.03.2023

Целью настоящей работы был сравнительный анализ влияния острого и хронического липополисахаридного стресса на поведение крыс в водном лабиринте Морриса и экспрессии mRNA провоспалительных цитокинов и *BDNF* в разных структурах мозга. Актуальность исследования связана с малой изученностью анализа влияния острого и хронического стресса на проявление когнитивных функций мозга с неоднозначными влияниями обоих типов стресса на гипоталамо-гипофизарную ось и экспрессию генов провоспалительных цитокинов, а также противоречивыми на этот счет данными литературы. В работе были использованы метод иммуноферментного анализа для оценки содержания кортикостерона в сыворотке крови и метод ПЦР – для оценки экспрессии генов провоспалительных цитокинов в разных структурах мозга. Острый липополисахаридный стресс (ЛПС-стресс) улучшал обучение в водном лабиринте Морриса. В среднем за период обучения крысы с острым ЛПС-стрессом проплывали меньшее расстояние до платформы, проводили меньше времени в периферической зоне бассейна (тигмотаксис) и плавали с меньшей скоростью по сравнению с контрольными животными, которым вводили физиологический раствор, и группой крыс, подвергавшейся хроническому ЛПС-стрессу. В пробе без платформы существенных различий по времени пребывания в квадранте платформы и проплываемому расстоянию у крыс разных групп не наблюдалось. Острый ЛПС-стресс вызывал увеличение экспрессии mRNA *TNF-α* и *IL-1β* в гиппокампе и миндалине, но не во фронтальной коре по сравнению с контрольными животными. Хронический ЛПС-стресс, хотя и увеличивал экспрессию mRNA *TNF-α* и *IL-1β* в миндалине и гиппокампе по сравнению с контрольными группами, но различия между группами проявлялись только на уровне тенденции, а экспрессия mRNA *BDNF*, по сравнению с контролем, не изменялась ни в одной из отмеченных структур. Экспрессия mRNA *IL-6* имела тренд к возрастанию при остром ЛПС-стрессе в миндалине и тренд к снижению – при хроническом ЛПС-стрессе в гиппокампе по сравнению с контрольными животными. В целом, наиболее яркие молекулярно-биохимические изменения происходили в миндалине и гиппокампе, в которых наблюдалось увеличение экспрессии mRNA интерлейкинов *TNF-α* и *IL-1β* как при остром, так и при хроническом ЛПС-стрессе. Изменения экспрессии mRNA *BDNF* во фронтальной коре отсутствовали.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: обучение, память, водный лабиринт, липополисахарид, острый и хронический стресс, интерлейкины, *BDNF*, ПЦР, миндалина, гиппокамп, фронтальная кора.

DOI: 10.31857/S0320972523040085, EDN: AKUTQU

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы хронический стресс, депрессии и другие психоневрологические расстройства все чаще связывают с воспалитель-

ными процессами и активностью иммунной системы мозга. Для исследования связи нейровоспаления с такими расстройствами широко используется модель провоспалительной липополисахаридной бактериальной интоксикации.

Принятые сокращения: ЛПС – липополисахарид; ЛПС-О – однократное введение ЛПС за 1 ч до начала обучения; ЛПС-Х – введение ЛПС для исследования влияния хронического стресса; ФИЗ – физраствор; ФИЗ-О – однократное введение ФИЗ за 1 ч до начала обучения; ФИЗ-Х – введение ФИЗ для исследования влияния хронического стресса; *BDNF* – нейротрофический фактор мозга; *TNF-α* – фактор некроза опухолей альфа.

* Адресат для корреспонденции.

Влияния липополисахаридов (ЛПС) во многом схожи (хотя есть и различия) с эффектами стрессов, вызываемых разными негативными факторами (многократный электрошок, материнское отлучение, социальная изоляция и т.д.), поэтому их действие рассматривается как провоспалительный стресс. Бактериальные ЛПС являются составным компонентом внешней части мембраны различных грамотрицательных бактерий. Молекулы ЛПС включают доминантную липофильную зону (липид А) и ковалентно связанную гидрофильную область поли- или олигосахаридов. Липид А является главным стимулятором врожденной и приобретенной иммунных систем у животных и человека. Первичными клетками мишенями для ЛПС являются фагоциты (периферические моноциты, тканевые макрофаги и нейтрофилы), которые экспрессируют связанный с мембраной антиген CD14 (mCD14) и рецепторы толл 4. ЛПС-связывающий протеин катализирует переход мономерного ЛПС из агрегатных комплексов, а иногда и прямо от грамотрицательных бактерий, к связывающему рецептору CD14 (mCD14) на поверхности фагоцитов, который, в свою очередь, ведет к высвобождению большого числа эндогенных медиаторов, таких как липидные медиаторы, редуцированные формы кислорода и цитокины/хемокины, через комплекс TLR4*MD-2 (см. обзор Alexander и Rietschel [1]). Среди цитокинов и хемокинов выделяют белки с провоспалительным и противовоспалительным действием: фактор некроза опухоли альфа (TNF- α); интерлейкины – IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18; интерфероны альфа и бета; MIF (macrophage migration inhibitory factor); MCP-1, MCP-3 (monocyte chemoattractant protein), MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2 (macrophage inflammatory protein) и трансформирующий фактор роста β – (TGF- β) [1].

В большинстве работ исследование влияния провоспалительного ЛПС-стресса на обучение и память проводят с использованием однократного (острого) введения бактериального эндотоксина. При этом ЛПС вводят животным разного возраста [2, 3], самцам или самкам [4–6], в разных дозах [7], с разным интервалом времени от момента введения ЛПС до начала проведения поведенческих опытов [8], изолированно или в комбинации с другими типами стрессов [9], в качестве основного или повторного, провоцирующего (challenge) стресса [10]. В то же время в литературе мало работ, в которых сравнивают между собой влияния острого и хронического ЛПС-стресса на обучение и память, уровень провоспалительных цитоки-

нов/кортикостерона и других маркеров нейровоспаления при обоих видах стресса. В частности, в работе Shaw et al. [11] на крысах было показано, что обучение в водном лабиринте Морриса проходило хуже при остром (однократном), чем при хроническом (5-кратном) введении ЛПС (100 мкг/кг), хотя уровень BDNF в зубчатой фасции гиппокампа в обоих случаях был примерно одинаковым. В другой похожей работе на мышах [12] существенных различий во влияниях однократного и 5-кратного введения ЛПС (250 мкг/кг) на латентный период нахождения скрытой под водой платформы и проплываемой дистанции по сравнению с контрольными животными и относительно друг друга обнаружено не было. Однако различия не проявлялись у молодых (2-месячных) мышей. У старых (годовалых) мышей показатели времени нахождения платформы и проплываемого расстояния под влиянием ЛПС-стресса ухудшались, особенно при хроническом введении ЛПС. Годовалые мыши с хроническим стрессом также больше времени проводили на периферии бассейна (тигмотаксис) и имели меньшую скорость плавания по сравнению с другими группами животных [12]. У крыс при многократном введении ЛПС (300 мкг/кг) (в первые 2 дня обучения с повтором через неделю тоже в первые 2 дня продолжающегося обучения) были обнаружены значительные отклонения угла направления плавания (heading angle) по отношению к цели и времени пребывания в квадранте платформы по сравнению с контрольными животными [13]. В работе на мышах [14] хронический (7-дневный) ЛПС-стресс (250 мкг/кг) не выявил существенных различий в скорости обучения в лабиринте Морриса по сравнению с контролем, хотя в тестовых пробах мыши, получавшие 7-дневный ЛПС-стресс, проводили значительно меньше времени в квадранте платформы, чем контрольные животные. При большой дозе (1 мг/кг) после 7-дневного введения ЛПС мыши обучались значительно хуже, чем контрольные животные; они проводили значительно меньше времени в квадранте платформы и реже пересекали зону платформы в тестовой пробе [15]. Важно помнить, что влияния ЛПС-стресса в водном лабиринте Морриса могут быть связаны не только с эффектами так называемого «болезненного состояния» (sickness behavior), которое обычно продолжается около суток [16], но и с другими факторами. В частности, влияние ЛПС может по-разному проявляться в зависимости от методических и процедурных условий эксперимента – размеров бассейна и платформы,

числа и времени использованных проб, временных промежутков между пробами, доз токсина, возраста животных и т.д. Возможно влияние ЛПС также на другие функции, такие как двигательная активность, мотивация поиска, уровень тревожности и др.

Целью настоящей работы было исследование на крысах влияния острого (1-дневного) и хронического (7-дневного) ЛПС-стресса на особенности обучения и памяти в водном лабиринте Морриса и экспрессию mRNA провоспалительных цитокинов, отражающих уровень воспаления мозга и экспрессию mRNA *BDNF*, как маркера нейропластичных изменений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты проводили на 40 крысах-самцах линии Вистар в возрасте 4–4,5 месяца, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА. Животных содержали в виварии при обычном 12-часовом световом режиме в свободном доступе к воде и стандартному корму.

Для исследования влияния острого стресса использовали липополисахарид («Sigma», США; серотип O26:B6), провоспалительный бактериальный токсин, выделенный из наружной оболочки *Escherichia coli*. Его вводили однократно внутрибрюшинно (ЛПС-О) (350 мкг/кг в объеме 1,0 мл/кг) за 1 ч до начала обучения 10 крысам ($n = 10$). Контрольным животным ($n = 10$) вводили физраствор (ФИЗ)

в том же объеме (ФИЗ-О). Для исследования влияния хронического стресса (ЛПС-Х) липополисахарид вводили внутрибрюшинно 10 крысам ($n = 10$) в дозе 200 мкг/кг, в объеме 1,0 мл/кг за 1 ч до начала обучения в течение 6 дней. Контрольным животным ($n = 10$) вводили в течение того же времени ФИЗ (ФИЗ-Х). Для создания острого и хронического провоспалительного стресса нами были выбраны умеренные дозы ЛПС (350 и 200 мкг/кг), но достаточно эффективные, чтобы вызвать поведенческие изменения в водном лабиринте Морриса по сравнению с контрольными животными. В литературе для этой цели применяют дозы в 1 мг/кг для острого [17] и хронического [18] применения; 500 мкг/кг – для острого введения [19] и 250 мкг/кг – для острого [11] и хронического [20] введения.

Схема проведения экспериментов по дням дана на рис. 1.

Обучение в водном лабиринте Морриса. Лабиринт представлял собой круглый пластиковый бассейн черного цвета диаметром – 1,5 м и высотой – 60 см («Noldus Ltd», Нидерланды), наполненный водой до уровня 30 см. Он располагался в углу большой комнаты и был отделен от остального пространства темной матерчатой шторой. На стенах комнаты и на шторах располагали картинки и/или знаки (квадраты, кресты и т.д.), которые служили в качестве внешних стимулов для ориентации животных в пространстве и фиксации положения в бассейне скрытой под водой платформы. Бассейн условно, с помощью двух пересекающихся

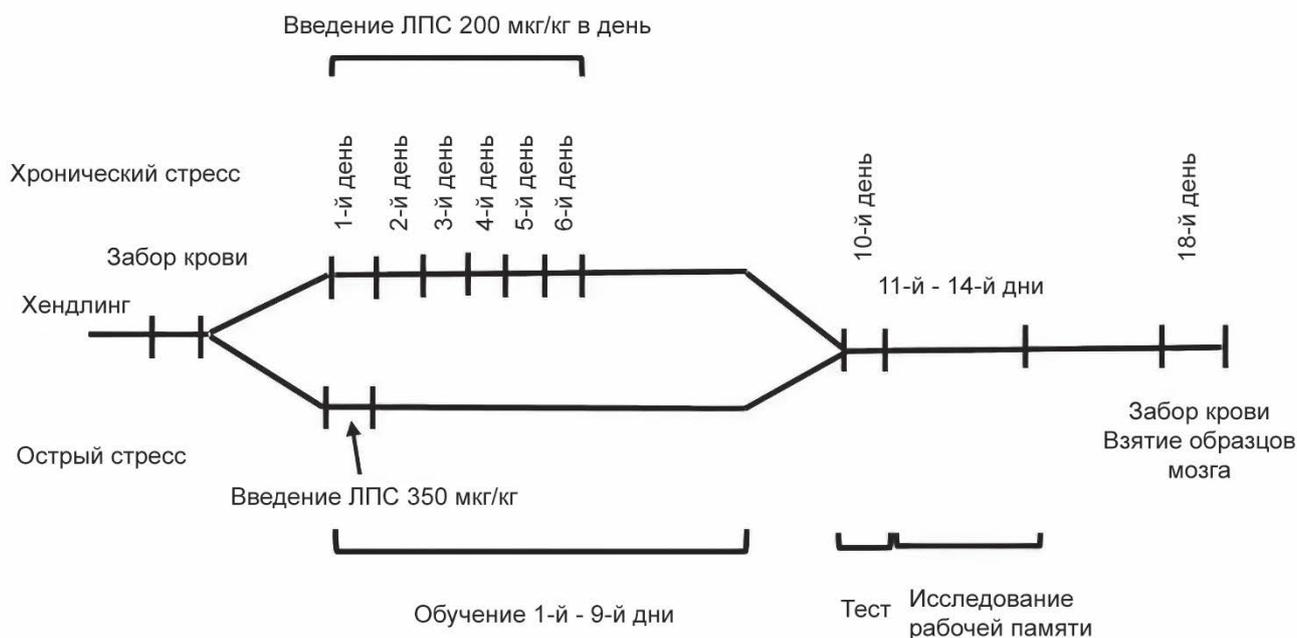


Рис. 1. Схема проведения экспериментов

через центр прямых, разделяли на 4 квадранта. Точки пересечения прямых со стенками бассейна служили в качестве мест погружения животных в воду (условно – север, юг, запад, восток). В середину одного из квадрантов помещали платформу (10 × 10 см) из прозрачного пластика, верхний край которой находился на 1,5–2,0 см ниже уровня воды. Во время опытов в комнате было тусклое освещение; во время опытов поддерживали постоянную температуру воды (22–24 °С).

Процедура тестирования долгосрочной памяти.

Обучение проводили в течение 9 дней по протоколу, изложенному в работе Grigoryan et al. [21]. В день проводили 2 пробы продолжительностью 60 с с интервалом примерно 10 мин [21]. После каждой пробы крыс вынимали из бассейна и протирали сухим полотенцем. Погружение крыс в воду в разные дни осуществляли всегда из двух точек, например, с юга – в первой пробе и с запада – во второй. Если крыса в течение 60 с не находила платформу, то ее сажали на платформу и оставляли на ней в течение 10–15 с. Перемещение крыс в бассейне регистрировали с помощью видеотрекинговой системы EthoVision («Noldus Ltd»). Оценивали время с момента погружения крыс в бассейн до момента нахождения платформы и залезания на нее (латентный период), проплываемое расстояние до платформы (дистанция), время пребывания в каждом квадранте, скорость плавания, время, проводимое на периферии бассейна.

На 10-й день проводили специальную пробу, во время которой платформу убирали из бассейна. Крыс погружали в бассейн на 60 с и измеряли время их пребывания в каждом квадранте и в зоне платформы.

Процедура тестирования рабочей (краткосрочной) памяти. Опыты проводили в течение 4 дней на тех же крысах по протоколу, изложенному в работе Grigoryan et al [21]. Ежедневно проводили 4 пробы продолжительностью 60 с каждая. Интервал между пробами составлял 30 с. Крыс в первой и в последующих пробах погружали в бассейн с разных стартовых точек (юг, север, запад, восток). Местоположение платформы в разные опытные дни было разным, но в течение одного дня оно оставалось неизменным. Принципиально важным в этой процедуре является интервал времени между пробами. В течение 30 с крысы должны удерживать в памяти местоположение безопасной платформы, и в следующих пробах быстро находить ее. Чем быстрее они это делают, тем круче у них градиент обучения и, следовательно, лучше рабочая память.

Иммуноферментный анализ крови. Забор крови из хвостовой вены производили за 2 дня до начала экспериментов в бассейне Морриса, декапитационную кровь брали при забое животных на 4-й день после окончания экспериментов в бассейне Морриса, после пробы на сахарозу и теста вынужденного плавания. Ряд экспериментальных работ свидетельствует, что дополнительное стрессорное воздействие, такое как вынужденное плавание, проведенное за 30–60 мин до момента забора крови, способно усиливать различие по биохимическим показателям крови между группами, ранее подвергнутыми стрессу [22, 23]. Тесты на сахарозу и вынужденное плавание выполнялись в рамках магистерской работы П. Филенко (кафедра биоорганической химии, биофак МГУ). Результаты описаны в его дипломной работе, в данной статье не приводятся из-за ограниченности объема статьи. Для получения сыворотки кровь центрифугировали 15 мин при 1500 g. Аликвоты сыворотки крови хранили при –80 °С до проведения иммуноферментного анализа. Уровень кортикостерона в сыворотке крови определяли с помощью наборов EIA-4164, Corticosterone ELISA («DRG», Германия) для проведения конкурентного иммуноферментного анализа. Это позволяло детектировать как свободный кортикостерон, так и связанный с транспортными белками. Концентрацию провоспалительного цитокина IL-1β определяли с помощью наборов Rat IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA («R&D Systems», США). Процедуру измерения проводили в соответствии с инструкцией производителя. Оптическую плотность раствора измеряли на микропланшетном ридере Hidex 425-301 («Hidex», Финляндия).

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени. Выделение образцов ткани гиппокампа, миндалина и фронтальной коры проводили после декапитации. Мозг вынимали, промывали в ледяном изотоническом растворе NaCl, на определенных уровнях мозга в соответствии с атласом мозга крысы [24] делались срезы мозга и, исходя из координат этого атласа, специальным инструментом (анатомической ложечкой) производили забор биоматериала из правого и левого полушарий мозга. Выделяли цельные гиппокампы, фронтальную кору и миндалину. Далее выделенные структуры замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °С. Образцы гомогенизировали в реагенте для выделения суммарной РНК, ExtractRNA («Евроген», Россия) и выделяли тотальную РНК. Концентрацию и чистоту образцов РНК проверяли на

Последовательности праймеров, использованных в работе

Ген	Последовательность праймеров 5'→3'	
<i>Il-1β</i>	F: TCTGTGACTCGTGGGATGAT	R: CACTTGTGGCTTATGTTCTGTGTC
<i>Il-6</i>	F: GCCACTGCCTTCCCTACTTCAC	R: GACAGTGCATCATCGCTGTTTCATAC
<i>Tnf-α</i>	F: GTCCAACCTCCGGGCTCAGAAT	R: ACTCCCCCGATCCACTCAG
<i>Bdnf</i>	F: CCATAAGGACGCGGACTTGTAC	R: AGACATGTTTTGCGGCATCCAGG
<i>Hprt</i>	F: CGTCGTGATTAGTGATGATGAAC	R: CAAGTCTTTCAGTCCTGTCCATA
<i>Ywhaz</i>	F: TTGAGCAGAAGACGGAAGGT	R: GAAGCATTGGGGATCAAGAA

приборе NanoPhotometer N60 («Implen», Германия). После этого образцы РНК очищали методом ДНКазной обработки с помощью набора DNaseI («Thermo Fisher Scientific», США), на реакцию очистки брали 2 мкг РНК, процедуру проводили в соответствии с рекомендациями производителя. Часть продукта после ДНКазной обработки брали для обратной транскрипции, оставшуюся часть использовали в качестве отрицательного контроля «без обратной транскрипции» в полимеразной цепной реакции. Первую часть РНК смешивали с random (dN10)-праймером и олиго(dT)-праймером («Евроген»), смесь инкубировали при 70 °С в течение 2 мин, затем смешивали с подготовленной смесью реактивов из набора MMLV RT kit («Евроген») с добавлением ингибитора РНКаз RNase Inhibitor («New England Biolabs», США); реакцию проводили в соответствии с рекомендациями производителей. Полученный в результате обратной транскрипции продукт разводили 8-кратно с использованием деионизованной воды, вторую часть очищенной РНК также разбавляли. В качестве реагента для проведения ПЦР в реальном времени использовали набор «Готовая смесь для ПЦР qPCRmix-HS SYBR+LowROX» («Евроген»). Реакцию проводили в амплификаторе для количественной ПЦР CFX384 Touch («Bio-Rad», США). Все реакции проводили в двух повторах в соответствии с протоколом: 5 мин при 95 °С, 1 цикл; 30 с при 95 °С, 30 с при требуемой для пары праймеров температуре и элонгация – 15 с при 72 °С, 40 циклов.

Последовательности использованных в работе праймеров. Праймеры подбирали на основе последовательностей из базы данных NCBI в программном пакете Lasergene PrimerSelect. Последовательности праймеров, использованных в работе, приведены в таблице.

В качестве нормировочных генов использовали *Hprt* и *Ywhaz*, выбранные по резуль-

татам анализа транскриптома гиппокампа крысы [25]. Относительную представленность транскриптов оценивали по методу $E^{-\Delta\Delta C_t}$ [26].

Эффективность реакции измеряли для каждого рабочего разведения праймеров методом серийных разведений. Во всех экспериментах эффективность реакции находилась в диапазоне 1,9–2,08. Для каждого гена было рассчитано значение $Eff^{(-\Delta\Delta C_t)}$, которое отражает изменения в экспрессии гена по сравнению с контрольным. Результат просчитывали относительно среднего геометрического значения для нормировочных генов. Каждую пробу дублировали, кроме того, для каждой пробы и каждого гена ставили контроль «без обратной транскрипции». Для каждой лунки контролировали температуру плавления продукта ПЦР.

Статистический анализ. Для обработки результатов использовали стандартную программу STATISTICA 8.0. Распределение значений исследованных параметров было проверено на нормальность по критерию Колмогорова–Смирнова (BasicStatistics, раздел DescriptiveStatistics). Если распределение значений анализируемого параметра соответствовало нормальному, то при сравнении групп крыс использовали дисперсионный анализ ANOVA, разделы одностороннего, факторного и повторных измерений. При post-hoc-анализе применяли критерий Ньюмана–Кеулса. Анализировали влияние факторов «ГРУППА» (4 градации: ЛПС-О, ФИЗ-О, ЛПС-Х и ФИЗ-Х), «ДНИ» (для долговременной памяти) или «ПРОБА» (для рабочей памяти) и взаимодействие этих факторов. Если распределение значений не соответствовало нормальному распределению, то в этом случае для сопоставления групп использовали тест Краскела–Уоллиса ANOVA с последующим сравнением групп с помощью множественных сравнений (непараметрическая статистика).

Для сопоставления двух групп использовали U-критерий Манна–Уитни. Для оценки случайности пребывания в целевом квадранте использовали Observed vs Expected тест Хи-квадрат (непараметрическая статистика). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$; отмечали наличие тенденции при $0,05 < p < 0,1$. Данные на рисунках представляли в виде средних значений \pm ошибки средних (SEM).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние острого и хронического ЛПС-стресса на обучение и долгосрочную память. В процессе обучения у всех групп крыс происходило уменьшение латентного периода достижения платформы и проплываемой дистанции (рис. 2, а). Для этих показателей значение фактора «ДНИ» было статистически значимым [$F_{8,324} = 25,306$; $p < 0,0001$ – для латентного периода и $F_{8,324} = 18,788$; $p < 0,0001$ – для проплываемой дистанции]. Взаимодействия факторов «ГРУППА \times ДНИ» по латентному периоду и дистанции между группами, испытывавшими ЛПС-стресс, и контрольными животными выявлено не было [$F_{8,324} = 1,7318$; $p = 0,09$]. Влияние фактора «ГРУППА» для проплываемой дистанции было статистически значимым [$F_{3,648} = 3,418$; $p < 0,05$] (рис. 2, б). Post-hoc-анализ выявил различия между ЛПС-О и ФИЗ-О ($p < 0,05$) и между ЛПС-О и ЛПС-Х ($p < 0,01$). Скорость плавания была значительно меньше у крыс, испытывавших острый и хронический ЛПС-стресс по сравнению с контрольными ФИЗ-группами, фактор «ГРУППА» [$F_{3,648} = 3,762$; $p = 0,0106$].

Крысы группы ЛПС-О проводили также существенно меньше времени [$F_{3,651} = 3,1356$; $p < 0,05$] и проплывали значительно меньшее расстояние [$F_{3,651} = 5,8286$; $p < 0,001$] в периферической зоне бассейна (тигмотаксис), чем крысы групп ФИЗ-О и ЛПС-Х ($p < 0,05$).

Тестовая проба без платформы. В тестовой пробе на 10-й день эксперимента с отсутствующей платформой статистически значимых различий между разными группами крыс обнаружено не было ни по времени проведения, ни по дистанции, проплываемой в квадранте платформы. Отношение времени пребывания в квадранте платформы к общему времени плавания составляло у крыс ЛПС-О $37,85 \pm 2,34\%$; ФИЗ-О – $32,92 \pm 2,88\%$; ЛПС-Х – $40,79 \pm 2,64\%$ и ФИЗ-Х – $34,31 \pm 3,38\%$, что статистически значимо демонстрирует не случайность пребывания в целевом квадранте ($p < 0,01$; критерий согласия Пирсона). Эти данные свидетельствуют о том, что после 9 дней обучения все группы крыс примерно одинаково обучались находить скрытую под водой платформу.

Влияние острого и хронического ЛПС-стресса на рабочую память. Влияние фактора «ПРОБА» было статистически значимым [$F_{3,1279} = 121,3$; $p < 0,0000$] при анализе времени достижения платформы и при анализе проплываемой до платформы дистанции [$F_{3,1279} = 73,362$; $p < 0,0000$]. Анализ влияния фактора «ГРУППА» при исследовании рабочей памяти выявил статистически значимые различия между исследуемыми группами по показателю времени достижения платформы [$F_{3,624} = 5,41$; $p < 0,001$]. Post-hoc-анализ показал, что эти различия происходили за счет

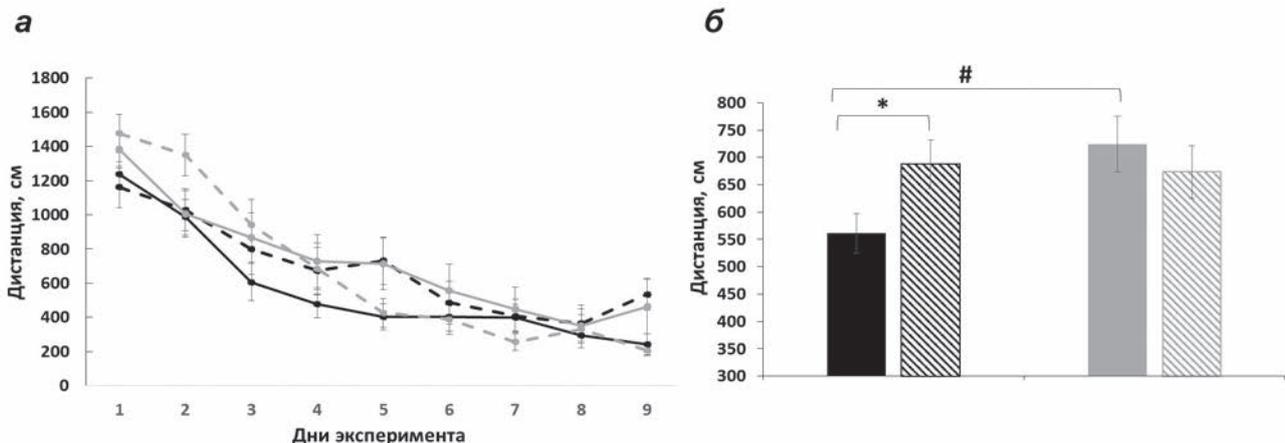


Рис. 2. Усредненная по двум пробам за каждый опытный день динамика изменений проплываемой до платформы дистанции в процессе обучения (а) и усредненная по всем пробам проплываемая дистанция до достижения платформы (б). Столбики и сплошные линии черного цвета – ЛПС-О, черные заштрихованные столбики и прерывистые линии – ФИЗ-О, серые – ЛПС-Х, серые заштрихованные столбики и прерывистые линии – ФИЗ-Х. Различия статистически значимы ($p < 0,05$) между ЛПС-О и ФИЗ-О – *; между ЛПС-О и ЛПС-Х – #

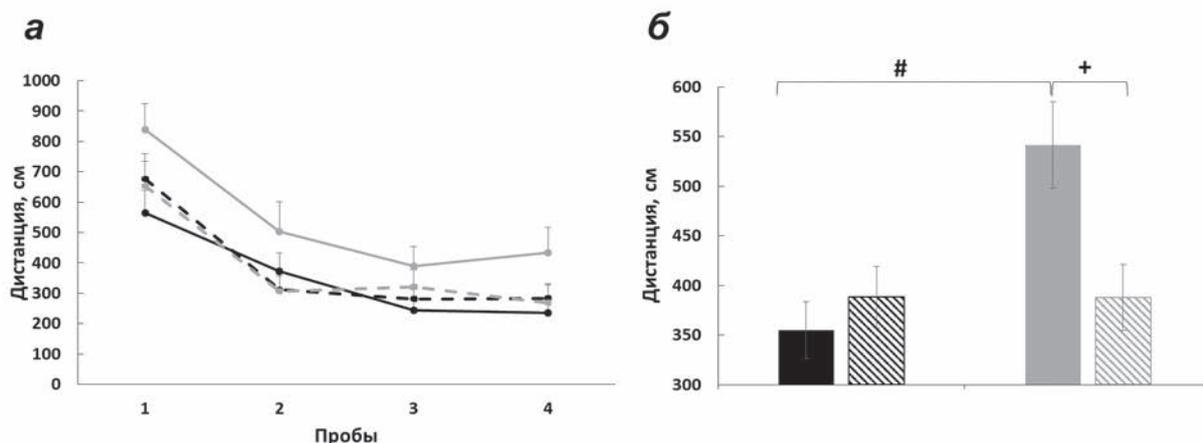


Рис. 3. Усредненная по 4-м дням за каждую (1–4) пробу дистанция, проплываемая до нахождения платформы (а), и усредненная по всем пробам проплываемая дистанция до достижения платформы (б). + $p < 0,05$ – различия статистически значимы между ЛПС-Х и ФИЗ-Х. Остальные обозначения, как на рис. 2

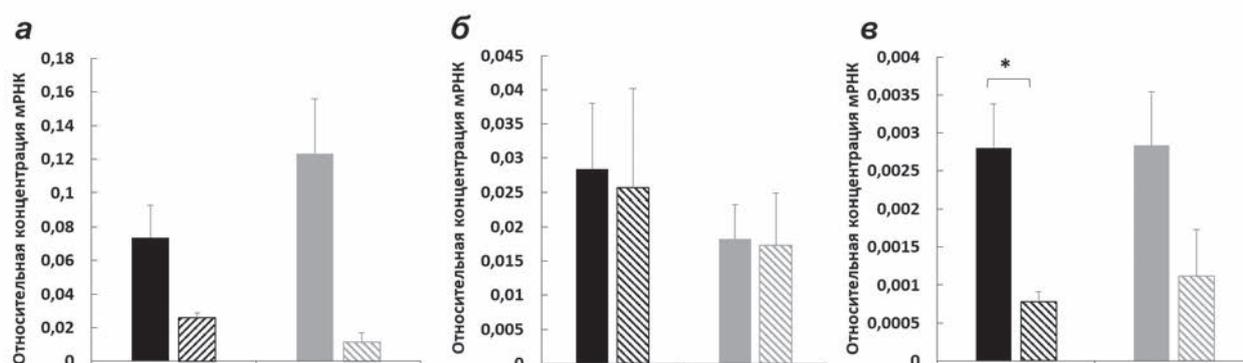


Рис. 4. Относительное количество mRNA *TNF- α* при остром и хроническом стрессе в миндалине (а), фронтальной коре (б) и гиппокампе (в). * Различия статистически значимы, $p < 0,05$. Остальные обозначения, как на рис. 2

крыс группы ЛПС-Х, которые существенно отставали по времени нахождения платформы от других групп ($p < 0,01$; рис. 3, а и б). Различий между группами ЛПС-О, ФИЗ-О и ФИЗ-Х обнаружено не было. На рис. 3, а видно, что отставание крыс группы ЛПС-Х прослеживалось на протяжении всех четырех проб, хотя при этом взаимодействия факторов «ГРУППА \times ПРОБА» выявлено не было [$F_{9,624} = 0,66$; $p > 0,05$].

Сходные различия между группами наблюдались по показателю проплываемой дистанции. Влияния фактора «ГРУППА» было статистически значимым [$F_{3,624} = 5,85$, $p < 0,001$], Post-hoc-анализ выявил различия между группой ЛПС-Х и остальными группами ($p < 0,005$). Взаимодействие факторов «ГРУППА \times ПРОБА» выявлено не было [$F_{9,624} = 0,383$; $p > 0,05$]. Несмотря на то что отставание по времени достижения платформы и проплываемой дистанции у крыс группы ЛПС-Х отчетливо наблюдалось в первой и последующих пробах, выявленные различия не отражают разницу в проявлениях

рабочей памяти, поскольку анализ не выявил взаимодействия факторов «ГРУППА \times ПРОБА».

Влияние острого и хронического стресса на биохимические показатели крови. Сопоставление уровней кортикостерона. Анализ уровня кортикостерона не выявил различий между крысами групп ЛПС-О и ФИЗ-О (2194,6 нмоль/литр \pm 201,4 и 2331,2 нмоль/литр \pm 97,3) и между группами ЛПС-Х и ФИЗ-Х (1613,2 нмоль/литр \pm 97,3 и 1574,8 нмоль/литр \pm 270,5). Однако у крыс с острым ЛПС-стрессом показатели уровня кортикостерона в крови были статистически значимо выше, чем у крыс с хроническим ЛПС-стрессом ($p < 0,5$).

Сравнение уровней интерлейкина-1 β . Анализ уровня интерлейкина IL-1 β выявил его повышенное содержание у крыс с ЛПС-О (60,2 пг/мл \pm 15,1 против 36,6 пг/мл \pm 12,7 – у ФИЗ-группы) и ЛПС-Х (59,4 пг/мл \pm 21,9 против 33,9 пг/мл \pm 6,1 – у ФИЗ-группы). Однако из-за большого разброса данных статистической значимости различия не достигли.

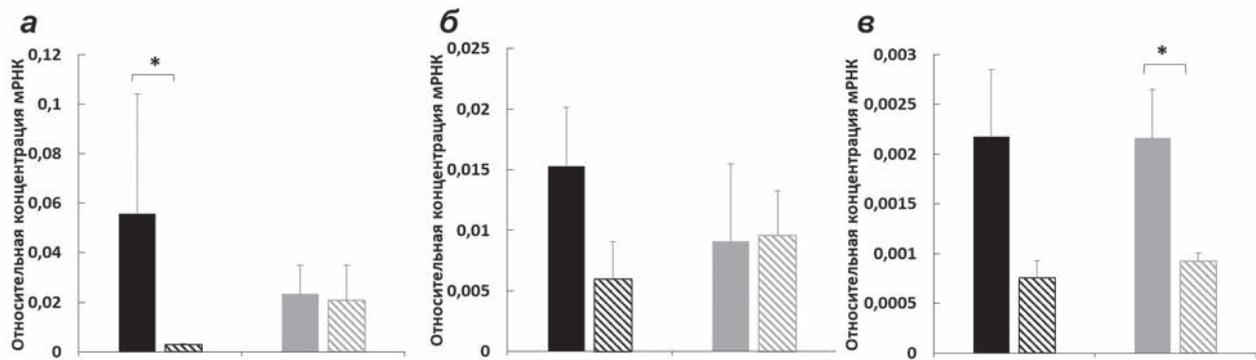


Рис. 5. Относительное содержание mRNA *IL-1β* при остром и хроническом стрессе в миндалине (а), фронтальной коре (б) и гиппокампе (в). Остальные обозначения, как на рис. 2

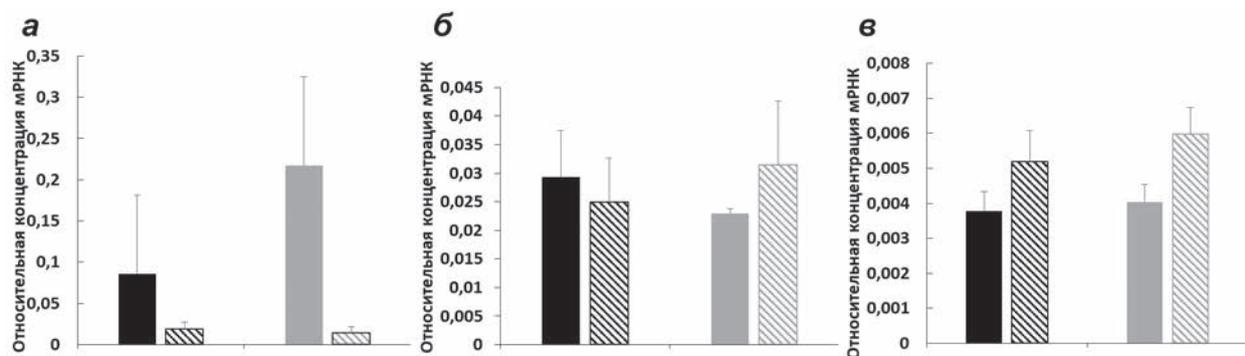


Рис. 6. Относительное содержание mRNA *IL-6* при остром и хроническом ЛПС-стрессе в миндалине (а), фронтальной коре (б) и гиппокампе (в). Остальные обозначения, как на рис. 2

Влияние острого и хронического ЛПС-стресса на экспрессию генов, связанных с нейровоспалением и нейропластичностью. Признаки нейровоспаления оценивали при помощи регистрации уровня экспрессии mRNA *TNF-α*, *IL-1β*, *IL-6*, а для изучения пластических изменений исследовали уровень экспрессии mRNA *BDNF*, который является маркером пластичности.

Уровень экспрессии *TNF-α*. В группах острого и хронического ЛПС-стресса уровень экспрессии mRNA гена провоспалительного цитокина *TNF-α* в миндалине был выше, чем в контроле; тест Краскела–Уоллиса: [$H(3, n = 14) = 9,8; p = 0,0203$]. В группах ЛПС-Х и ЛПС-О этот показатель был больше, чем в группах ФИЗ-Х и ФИЗ-О (рис. 4, а). Уровень экспрессии этого цитокина в группе ЛПС-Х был 1,67 раза больше, чем в группе ЛПС-О. Различий во влиянии острого и хронического провоспалительного ЛПС-стресса на экспрессию mRNA *TNF-α* во фронтальной коре обнаружено не было (рис. 4, б). В гиппокампе уровни экспрессии mRNA *TNF-α* между ЛПС-О и ФИЗ-О существенно различались между собой; тест Краскела–Уоллиса:

[$H(3, n = 18) = 7,839766; p = 0,0494$], а между ЛПС-Х и ФИЗ-Х – проявлялись с различиями на уровне тенденции (рис. 4, в). Между группами крыс ЛПС-О и ЛПС-Х различий в уровне экспрессии *TNF-α* выявлено не было.

Уровень экспрессии mRNA *IL-1β* в миндалине у группы ЛПС-О значимо превышал уровень экспрессии группы ФИЗ-О; тест Краскела–Уоллиса: [$H(3, n = 15) = 8,835833; p = 0,0316$]. В группах ЛПС-Х и ФИЗ-Х различий выявлено не было (рис. 5, а). Хотя уровень экспрессии mRNA *IL-1β* в группе острого стресса был больше, чем в группе хронического стресса, статистически значимых различий между ними не наблюдалось.

Во фронтальной коре ЛПС-О приводил к некоторому повышению уровня экспрессии *IL-1β* относительно контрольной группы, но его было недостаточно для проявления статистически значимых различий. Между группами ЛПС-Х и ФИЗ-Х различий в уровне экспрессии mRNA *IL-1β* также не было обнаружено (рис. 5, б). Уровень экспрессии mRNA *IL-1β* в гиппокампе у крыс ЛПС-О увеличивался в 2,87 раза, а у крыс группы ЛПС-Х – в 2,34 раза по сравнению с контрольными данными;

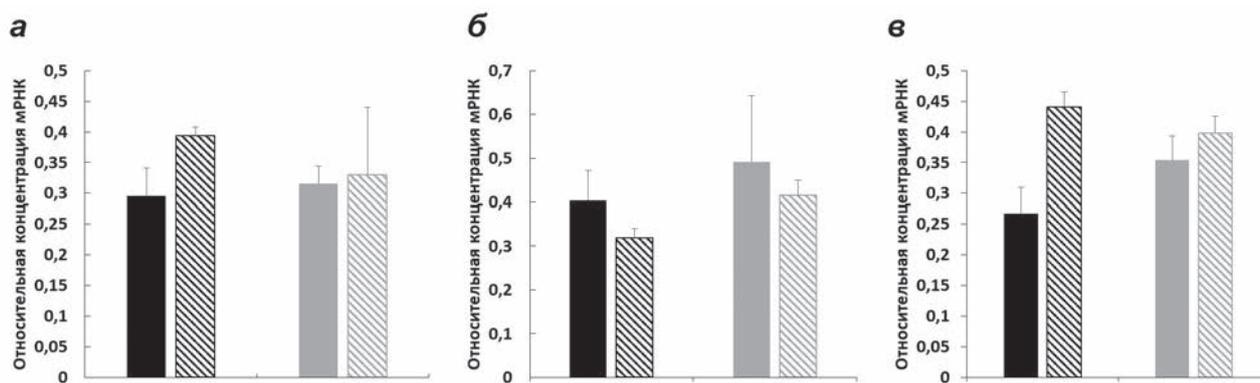


Рис. 7. Относительное количество mRNA *BDNF* при остром и хроническом ЛПС-стрессе в миндалинах (а), фронтальной коре (б) и гиппокампе (в). Остальные обозначения, как на рис. 2

тест Краскела–Уоллиса: [$H(3, n = 18) = 10,33801$; $p = 0,0159$]. Между группами ЛПС-О и ЛПС-Х различия не проявились (рис. 5, в).

Уровень экспрессии mRNA *IL-6*. Существенного повышения уровня экспрессии mRNA *IL-6* в исследованных структурах мозга обнаружено не было, за исключением тренда к увеличению в миндалинах у группы ЛПС-Х по сравнению с ФИЗ-Х ($p = 0,0819$) и тренда к уменьшению в гиппокампе у ЛПС-Х по сравнению с группой ФИЗ-Х ($p = 0,0974$) (рис. 6).

Экспрессия mRNA *BDNF*. Провоспалительный ЛПС-стресс не оказывал существенного влияния на экспрессию mRNA *BDNF* в миндалинах и фронтальной коре. Небольшое статистически незначимое снижение экспрессии mRNA *BDNF* происходило в гиппокампе в группе ЛПС-О по сравнению с группой ФИЗ-О ($p = 0,1879$) (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Таким образом, крысы, испытывавшие острый ЛПС-стресс в наших опытах, быстрее, чем крысы с хроническим ЛПС-стрессом, находили скрытую под водой платформу и проплывали до нее меньшее расстояние по сравнению с контрольной и ЛПС-Х группами. Они проводили также меньше времени и проплывали меньшее расстояние в периферической зоне бассейна (тигмотаксис), чем контрольные и ЛПС-Х группы крыс, причем скорость плавания у них, как и у крыс с ЛПС-Х-стрессом, была меньше, чем у контрольных животных. В тестовой пробе без платформы время пребывания крыс в квадранте платформы и проплываемое расстояние в этом квадранте у разных групп не отличались существенно друг от друга. Нам известна только одна работа на крысах, в которой, как и в нашей работе, срав-

нивались влияния острого и хронического (5-кратного) стресса, вызванного введением ЛПС [11]. В ней обучение проводили в течение 8 дней с перерывом в 3 дня после 5-го дня. Ежедневно проводили по 5 проб с интервалом в 5 с. В опытах участвовали 3 группы крыс: 1) получавшие ЛПС (100 мкг/кг) только один раз в первый день обучения, 2) получавшие ЛПС в течение 5 дней, 3) контрольная группа, получавшая физраствор. В противоположность нашим данным, группа с однократным введением ЛПС (острый стресс) показала наихудший навык по углу направления движения к платформе (heading angle), латентному периоду и проплываемому расстоянию до платформы. У нее была также выше скорость плавания. Группа с хроническим ЛПС-стрессом не отличалась от контрольных животных. Во время тестовой пробы без платформы наблюдались различия по проплываемому расстоянию между группами с острым и хроническим стрессом, но различия между каждой из этих групп и контролем не наблюдалось. Детальный анализ данных и рисунков рассматриваемой работы показал, что группа с острым ЛПС-стрессом отличалась от контрольной группы ФИЗ по углу направления к платформе только на 5-й и 6-й дни обучения, а по латентному периоду — только на 4-й и 8-й дни. Различий в обучении между контрольной группой (ФИЗ) и группой с хроническим ЛПС-стрессом не наблюдалось ни в один из дней обучения. Наименьшее расстояние до платформы проплывали крысы с хроническим введением ЛПС. Скорость была наименьшей также у крыс, испытывавших хронический стресс. У крыс с острым стрессом в целом она была больше, чем у других групп, но в разные дни различия могли не проявляться. В пробе без платформы различий между группой ФИЗ и группой с острым ЛПС-стрессом по проплываемой дистанции не наблюдалось,

но значимой была разница между группами с острым и хроническим стрессом: первые проплывали большее расстояние. Нетрудно видеть, что наши данные и результаты, полученные в работе Shaw et al. [11], существенно различаются между собой, чему может быть ряд причин, и прежде всего, существенные различия в процедуре опытов. В частности, мы использовали ежедневно только две пробы с интервалом 10 мин, а в работе Shaw et al. [11] в день проводили по 5 проб с интервалом всего в 5 с, причем в значительно большем по размеру бассейне ($D = 2$ метра). Последние два обстоятельства могли вызывать утомление животных и усложнять поиск ими скрытой под водой платформы. На наш взгляд, это создавало у крыс дополнительный стресс, который отражался на скорости обучения. Известно, что ЛПС и стимулируемые им цитокины могут оказывать как тормозные, так и облегчающие эффекты на процессы памяти, которые зависят от применяемой дозы. Первые вызываются при больших (патологических) дозах, тогда как вторые — при малых (физиологических) дозах [27]. В наших опытах острый провоспалительный ЛПС-стресс мог вызывать облегчение поиска скрытой под водой платформы по причине невысокой концентрации введенного токсина. Возможно, что этой дозы было недостаточно (даже при хроническом применении) для вызова интенсивного нейровоспалительного процесса, проявляемого в форме поведенческого «болезненного состояния», существенного роста уровня цитокинов и влияния их на систему стресса (ГГНС). На самом деле, уровень исследованных нами цитокинов в некоторых структурах (в частности, в гиппокампе) существенно не отличался при остром и хроническом ЛПС-стрессе, хотя различия с контролем были существенными, что свидетельствует о развитии нейровоспалительного процесса. Имеются данные, согласно которым обучение облегчалось даже при хроническом стрессе, вызванном непрерывным введением ЛПС в четвертый желудочек со скоростью 0,25 мкл/ч на протяжении 74 дней, что приводило к значительному уменьшению латентного периода нахождения платформы [28]. При введении 20 мкг ЛПС в поле СА1 гиппокампа в течение 5 дней происходили такие же изменения [29]. Следует отметить, что нередко наблюдаются расхождения между биохимическими и поведенческими данными. Например, в работе на мышах при высоких уровнях провоспалительного цитокина $IL-1\beta$ в гиппокампе в ответ на внутрибрюшинное введение большой дозы ЛПС (1,25 мг/кг) время, проведенное в квад-

ранте платформы, и число пересечений зоны платформы у крыс, получавших ЛПС, и контрольных животных не отличалось [30].

Известно, что слабый стресс оказывает положительное влияние не только на обучение, но и на общую приспособляемость организма и его устойчивость к последующим стрессам. В частности, на модели стресса социальной изоляции нами было показано, что крысы-изолянты лучше обучаются находить 4 рукава с пищей в 8-канальном радиальном лабиринте, чем контрольные животные [31].

Работ, касающихся сравнения влияния острого и хронического ЛПС-стресса на проявления рабочей памяти, в литературе нам найти не удалось. В наших опытах, хотя латентный период и пройденная дистанция во всех пробах были наибольшими у группы крыс с хроническим ЛПС-стрессом, сказать о том, что у них была слабее выражена рабочая память, нельзя, поскольку анализ ANOVA не выявил взаимодействия эффектов «ГРУППА × ПРОБА». Cunningham и Sanderson [32] считают, что для оценки обучения в водном лабиринте Морриса более адекватным поведенческим показателем является пройденная дистанция, а влияние сильного стресса больше связано не с когнитивными, а с эмоциональными, двигательными или мотивационными компонентами поведения. То есть, во-первых, стресс мог приводить к снижению двигательной активности, и в результате этого — к снижению скорости плавания. Во-вторых, стресс мог усиливать эмоционально-негативное состояние и тревожность, что меняло у крыс аллоцентрическую стратегию поведения на эгоцентрическую. Последнее обстоятельство приводит к значительному усилению тигмотаксиса (плавания у стенок бассейна) и избеганию центральных областей бассейна.

Согласно полученным нами биохимическим данным, можно говорить о наличии процесса нейровоспаления в группах острого и хронического стресса, причем наиболее очевидно этот процесс протекает в миндалине. Хотя в некоторых структурах и наблюдаются отличия в уровнях экспрессии mRNA провоспалительных цитокинов, существенных различий между группами острого и хронического стресса по остроте протекания нейровоспаления в наших опытах получить не удалось. Согласно данным по экспрессии mRNA *BDNF*, группы, подвергшиеся стрессу, должны хуже поддаваться обучению, причем, учитывая наблюдаемые изменения в гиппокампе, худшие результаты должна была бы демонстрировать группа острого стресса. Zhu et al. [33] исследовали

с помощью иммуноферментного метода экспрессию цитокинов (*IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α*) и *BDNF* в гиппокампе крыс, которых подвергали 3- и 7-дневному ЛПС-стрессу в процессе обучения в водном лабиринте Морриса. По сравнению с контрольными крысами, которым вводили ФИЗ, обе группы с ЛПС-стрессом хуже обучались находить скрытую под водой платформу (по латентному периоду нахождения и времени, проведенному в квадранте платформы) и содержали больше цитокинов *IL-1 β* , *IL-6*, *TNF- α* в гиппокампе при неизменном уровне *BDNF*. Такие же данные по *BDNF* были получены в работе Shaw et al. [11] с помощью метода ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Данные опытов в работе Zhu et al. [33] с некоторыми оговорками совпадают с нашими биохимическими результатами в части по содержанию *IL-1 β* , *TNF- α* и *BDNF* в гиппокампе у крыс, подвергнутых хроническому ЛПС-стрессу, а данные опытов в работе Shaw et al. [11] совпадают по *BDNF*. Причем одной из оговорок является то, что мы использовали для оценки метод ПЦР, который позволяет определить уровень транскрипционной активности (уровень mRNA) генов, кодирующих белки провоспалительных цитокинов и *BDNF*, а в работах Shaw et al. [11] и Zhu et al. [33] применяли иммуноферментный анализ, который оценивает уровень экспрессии самих этих медиаторов. Кроме того, в нашей работе экспрессия mRNA *IL-1 β* и *TNF- α* была больше в гиппокампе не только при хроническом, но и при остром ЛПС-стрессе. А экспрессия mRNA *IL-6* была больше в миндалине при остром, а в гиппокампе – при хроническом стрессе по сравнению с контрольными показателями, как и в работе Zhu et al. [33]. Sparkman et al. [34] специально исследовали роль цитокина *IL-6* в проявлениях памяти в опытах на мышах. Процедура обучения нахождения скрытой под водой платформы в водном бассейне Морриса в их опытах была следующей: две группы мышей (одна – контрольная *IL-6*^(+/+), а другая – с нокаутом гена *IL-6*^(-/-)) получали 3 пробы в день в течение 7 дней. Положение платформы каждый день меняли. Интересно то, что если после выработки навыка нахождения скрытой под водой платформы мышам группы *IL-6*^(+/+) вводили внутрибрюшинно ЛПС, то память у них существенно ухудшалась. Если ЛПС вводили группе мышей с нокаутом *IL-6*^(-/-), то память у них не изменялась. При этом содержание в сыворотке *IL-1 β* и *TNF- α* у мышей обеих групп после введения ЛПС в равной степени увеличивалось, но повышенные уровни *IL-1 β* и *TNF- α* при отсутствии интерлейкина *IL-6* были недо-

статочными, чтобы ослабить память у нокаутных мышей. Другими словами, при отсутствии интерлейкина *IL-6* другие провоспалительные цитокины оказались малоэффективными, чтобы ослабить память. Надо отметить, что данные по влиянию ЛПС-стресса на уровень *BDNF* в литературе противоречивые (см. обзор Lima Giacobbo et al. [35]). Так, Elkabes et al. [36] не обнаружили методом ПЦР изменений в уровне экспрессии mRNA *BDNF* между контрольной группой и группой, получавшей ЛПС, тогда как в работе Miwa et al. [37] с помощью того же метода ЛПС-стресс вызывал увеличение экспрессии mRNA *BDNF*. Дополнительно они исследовали экспрессию *BDNF* в культуре микроглии из мозга эмбрионов крыс, подверженных влиянию ЛПС. По их мнению, ЛПС активирует микроглию, которая участвует в нейрональной регенерации за счет продукции нейротрофинов и увеличения концентрации *BDNF*, что оказывает нейропротекторное влияние в мозге эмбриона. Отрицательные результаты по *BDNF* в работе Sparkman et al. [34] авторы связывают с малой дозой ЛПС, а также, возможно, с удаленным взятием пробы (на 10-й день опытов), при котором влияние ЛПС уже могло полностью исчезнуть. Такое объяснение применимо и к нашим результатам. Нейровоспалительные процессы под влиянием ЛПС, ухудшение обучения и пространственной памяти в лабиринте Морриса с усилением активности микроглии наблюдали также в опытах на мышах [38]. Уровни интерлейкинов *IL-4* и *IL-10* в сыворотке крови и в гомогенатах мозга под влиянием ЛПС уменьшались, уровни *TNF- α* , *IL-1 β* , простагландин *E2* и оксида азота – возрастали [38]. Введение мышам ЛПС ухудшало обучение в лабиринте Морриса и значительно повышало уровни цитокинов *TNF- α* и *IL-6*, тогда как уровни *BDNF* значительно снижались [39, 40]. О том, что ухудшение обучения в водном лабиринте Морриса происходит под влиянием развития нейровоспаления и действием цитокинов, в частности *IL-1 β* , было показано в опытах на мышах в работе Arai et al. [8]. Авторы обнаружили, что введение ЛПС приводит к ухудшению обучения в водном лабиринте Морриса в связи с усилением продукции цитокина *IL-1 β* , а применение антагониста цитокина выравнивает обучение у этой группы по сравнению с контролем.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Острый ЛПС-стресс улучшал обучение крыс в водном лабиринте Морриса по сравне-

нию с контрольными животными и группой с хроническим ЛПС-стрессом. Крысы с острым стрессом быстрее находили скрытую под водой платформу и проплывали до нее меньшее расстояние. Они также меньше времени проводили в периферической зоне бассейна (тигмотаксис) и плавали с меньшей скоростью, чем другие группы животных. В пробе без платформы время пребывания в квадранте платформы и проплываемое расстояние у крыс разных групп существенно не различалось. Острый ЛПС-стресс вызывал увеличение экспрессии mRNA *TNF- α* и *IL-1 β* в гиппокампе и миндале, но не во фронтальной коре по сравнению с контрольными животными. Хронический ЛПС-стресс, хотя и увеличивал экспрессию *TNF- α* и *IL-1 β* в миндале и гиппокампе по сравнению с контрольными группами, но различия между группами проявились только на уровне тренда, а экспрессия mRNA *BDNF*, по сравнению с контролем, не изменялась ни в одной из отмеченных структур. Выявлены тренды к возрастанию mRNA *IL-6* при остром ЛПС-стрессе в миндале и к снижению – при хроническом ЛПС-стрессе в гиппокампе по сравнению с контрольными животными. В целом, наиболее яркие молеку-

лярно-биохимические изменения происходили в миндале и гиппокампе, в которых наблюдалось увеличение экспрессии mRNA *TNF- α* и *IL-1 β* как при остром, так и при хроническом ЛПС-стрессе и отсутствие изменений в экспрессии mRNA *BDNF* во фронтальной коре.

Вклад авторов. Зайченко М.И. – руководство экспериментальной работой, участие в опытах и обсуждении результатов; Филенко П. – участие в экспериментальной работе и выполнение биохимической части работы; Сидорина В. – участие в поведенческих опытах; Григорьян Г.А. – анализ литературы и полученных данных, написание статьи.

Финансирование. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-015-00129 А).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В экспериментах соблюдались принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского сообщества (2010/63/EU) и положениях ИВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alexander, C., and Rietschel, E. T. (2001) Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity, *J. Endotoxin Res.*, **7**, 167-202, doi: 10.1177/09680519010070030101.
- Груздева В. А., Шаркова А. В., Зайченко М. И., Григорьян Г. А. (2021) Влияние раннего провоспалительного стресса на проявление импульсивного поведения у крыс разного возраста и пола, *Журн. высш. нервн. деят.*, **71**, 114-125, doi: 10.31857/S0044467721010056.
- Kupferschmid, B. J., and Therrien, B. A. (2018) Spatial learning responses to lipopolysaccharide in adult and aged rats, *Biol. Res. Nurs.*, **20**, 32-39, doi: 10.1177/1099800417726875.
- Зайченко М. И., Шаркова А. В., Павлова И. В., Григорьян Г. А. (2022) Половые различия во влияниях раннего провоспалительного стресса на обучение и память взрослых крыс в водном лабиринте Морриса, *Журн. высш. нервн. деят.*, **72**, 233-249, doi: 10.31857/S0044467722020125.
- Stepanichev, M. Y., Goryakina, T., Manolova, A., Lazareva, N., Kvichanskii, A., Tretyakova, L., Volobueva, M., and Gulyaeva, N. (2021) Neonatal proinflammatory challenge evokes a microglial response and affects the ratio between subtypes of GABAergic interneurons in the hippocampus of juvenile rats: sex-dependent and sex-independent effects, *Brain Struct. Funct.*, **226**, 563-574, doi: 10.1007/s00429-020-02199-z.
- Григорьян Г. А. (2020) Половые различия в поведении и биохимических маркерах у животных в ответ на нейровоспалительный стресс, *Усп. физiol. наук*, **51**, 18-32, doi: 10.31857/S0301179820010051.
- Alzahrani, N. A., Bahaidrah, K. A., Mansouri, R. A., Alsufiani, H. M., and Alghamdi, B. S. (2022) Investigation of the optimal dose for experimental lipopolysaccharide-induced recognition memory impairment: behavioral and histological studies, *J. Integr. Neurosci.*, **21**, 49, doi: 10.31083/j.jin2102049.
- Arai, K., Matsuki, N., Ikegaya, Y., and Nishiyama, N. (2001) Deterioration of spatial learning performances in lipopolysaccharide-treated mice, *Jpn. J. Pharmacol.*, **87**, 195-201, doi: 10.1254/jjp.87.195.
- Couch, Y., Trofimov, A., Markova, N., Nikolenko, V., Steinbusch, H. W., Chekhonin, V., et al. (2016) Low-dose lipopolysaccharide (LPS) inhibits aggressive and augments depressive behaviours in a chronic mild stress model in mice, *J. Neuroinflammation*, **13**, 108, doi: 10.1186/s12974-016-0572-0.
- Dang, R., Guo, Y. Y., Zhang, K., Jiang, P., and Zhao, M. G. (2019) Predictable chronic mild stress promotes

- recovery from LPS-induced depression, *Mol. Brain*, **12**, 42, doi: 10.1186/s13041-019-0463-2.
11. Shaw, K. N., Commins, S., and O'Mara, S. M. (2001) Lipopolysaccharide causes deficits in spatial learning in the water maze but not in BDNF expression in the rat dentate gyrus, *Behav. Brain Res.*, **124**, 47-54, doi: 10.1016/s0166-4328(01)00232-7.
 12. Sparkman, N. L., Martin, L. A., Calvert, W. S., and Boehm, G. W. (2005) Effects of intraperitoneal lipopolysaccharide on Morris maze performance in year-old and 2-month-old female C57BL/6J mice, *Behav. Brain Res.*, **159**, 145-151, doi: 10.1016/j.bbr.2004.10.011.
 13. Kupferschmid, B. J., Rowsey, P. J., and Riviera, M. (2020) Characterization of spatial learning and sickness responses in aging rats following recurrent lipopolysaccharide administration, *Biol. Res. Nurs.*, **22**, 92-102, doi: 10.1177/1099800419875824.
 14. Kahn, M. S., Kranjac, D., Alonzo, C. A., Haase, J. H., Cedillos, R. O., McLinden, K. A., Boehm, G. W., and Chumley, M. J. (2012) Prolonged elevation in hippocampal A β and cognitive deficits following repeated endotoxin exposure in the mouse, *Behav. Brain Res.*, **229**, 176-184, doi: 10.1016/j.bbr.2012.01.010.
 15. Xin, Y. R., Jiang, J. X., Hu, Y., Pan, J. P., Mi, X. N., Gao, Q., Xiao, F., Zhang, W., and Luo, H. M. (2019) The Immune system drives synapse loss during lipopolysaccharide-induced learning and memory impairment in mice, *Front. Aging Neurosci.*, **11**, 279, doi: 10.3389/fnagi.2019.00279.
 16. Barter, J., Kumar, A., Rani, A., Colon-Perez, L. M., Febo, M., and Foster, T. C. (2020) Differential effect of repeated lipopolysaccharide treatment and aging on hippocampal function and biomarkers of hippocampal senescence, *Mol. Neurobiol.*, **57**, 4045-4059, doi: 10.1007/s12035-020-02008-y.
 17. Arab, Z., Hosseini, M., Marefati, N., Beheshti, F., Anaegoudari, A., Sadeghnia, H. R., and Boskabady, M. H. (2022) Neuroprotective and memory enhancing effects of *Zataria multiflora* in lipopolysaccharide-treated rats, *Vet. Res. Forum*, **13**, 101-110, doi: 10.30466/vrf.2020.117553.2786.
 18. Keymoradzadeh, A., Hedayati, Ch. M., Abedinzade, M., Gazor, R., Rostampour, M., and Taleghani, B. K. (2020) Enriched environment effect on lipopolysaccharide-induced spatial learning, memory impairment and hippocampal inflammatory cytokine levels in male rats, *Behav. Brain Res.*, **394**, 112814, doi: 10.1016/j.bbr.2020.112814.
 19. Jin, Y., Peng, J., Wang, X., Zhang, D., and Wang, T. (2017) Ameliorative effect of ginsenoside rg1 on lipopolysaccharide-induced cognitive impairment: role of cholinergic system, *Neurochem. Res.*, **42**, 1299-1307, doi: 10.1007/s11064-016-2171-y.
 20. Sohroforouzani, A. M., Shakerian, S., Ghanbarzadeh, M., and Alaei, H. (2020) Treadmill exercise improves LPS-induced memory impairments via endocannabinoid receptors and cyclooxygenase enzymes, *Brain Res.*, **380**, 112440, doi: 10.1016/j.bbr.2019.112440.
 21. Grigoryan, G. A., Mitchell, S. N., Hodges, H., Sinden, J. D., and Gray, J. A. (1994) Are the cognitive-enhancing effects of nicotine in the rat with lesions to the forebrain cholinergic projection system mediated by an interaction with the noradrenergic system? *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **49**, 511-521, doi: 10.1016/0091-3057(94)90063-9.
 22. Shanks, N., Larocque, S., and Meaney, M. J. (1995) Neonatal endotoxin exposure alters the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: early illness and later responsivity to stress, *J. Neurosci.*, **15**, 376-384, doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-01-00376.1995.
 23. Shanks, N., Windle, R. J., Perks, P. A., Harbuz, M. S., Jessop, D. S., Ingram, C. D., and Lightman, S. L. (2000) Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 5645-5650, doi: 10.1073/pnas.090571897.
 24. Paxinos, G., and Watson, C. (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, 6th Edn, San Diego.
 25. Dobryakova, Y. V., Kasianov, A., Zaichenko, M. I., Stepanichev, M. Y., Chesnokova, E. A., Kolosov, P. M., Markevich, V. A., and Bolshakov, A. P. (2018) Intracerebroventricular administration of 192IgG-saporin alters expression of microglia-associated genes in the dorsal but not ventral hippocampus, *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, 429, doi: 10.3389/fnmol.2017.00429.
 26. 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**, 402-408, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
 27. Mizobuchi, H., Yamamoto, K., Tsutsui, S., Yamashita, M., Nakata, Y., Inagawa, H., Kohchi, C., and Soma, G. I. (2020) A unique hybrid characteristic having both pro- and anti-inflammatory phenotype transformed by repetitive low-dose lipopolysaccharide in C8-B4 microglia, *Sci. Rep.*, **10**, 8945, doi: 10.1038/s41598-020-65998-8.
 28. Hauss-Wegrzyniak, B., Vraniak, P. D., and Wenk, G. L. (2000) LPS-induced neuroinflammatory effects do not recover with time, *Neuroreport*, **11**, 1759-1763, doi: 10.1097/00001756-200006050-00032.
 29. Tanaka, S., Ide, M., Shibutani, T., Ohtaki, H., Numazawa, S., Shioda, S., and Yoshida, T. (2006) Lipopolysaccharide-induced microglial activation induces learning and memory deficits without neuronal cell death in rats, *J. Neurosci. Res.*, **83**, 557-566, doi: 10.1002/jnr.20752.
 30. Huang, Z. B., Wang, H., Rao, X. R., Liang, T., Xu, J., Cai, X. S., and Sheng, G. Q. (2010) Effects of immune activation on the retrieval of spatial memory, *Neurosci. Bull.*, **26**, 355-364, doi: 10.1007/s12264-010-0622-z.
 31. Grigoryan, G. A., Weiss, I., and Feldon, I. (2010) Social isolation improves working memory at reversal

- but not primaty radial-arm learning in rats, *Zhurn. Vysch. Nervn. Deyat.*, **60**, 560-567.
32. Cunningham, C., and Sanderson, D. J. (2008) Malaise in the water maze: untangling the effects of LPS and IL-1beta on learning and memory, *Brain Behav. Immun.*, **22**, 1117-1127, doi: 10.1016/j.bbi.2008.05.007.
 33. Zhu, B., Wang, Z. G., Ding, J., Liu, N., Wang, D. M., Ding, L. C., and Yang, C. (2014) Chronic lipopolysaccharide exposure induces cognitive dysfunction without affecting BDNF expression in the rat hippocampus, *Exp. Ther. Med.*, **7**, 750-754, doi: 10.3892/etm.2014.1479.
 34. Sparkman, N. L., Buchanan, J. B., Heyen, J. R., Chen, J., Beverly, J. L., and Johnson, R. W. J. (2006) Interleukin-6 facilitates lipopolysaccharide-induced disruption in working memory and expression of other proinflammatory cytokines in hippocampal neuronal cell layers, *Neuroscience*, **26**, 10709-10716, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3376-06.2006.
 35. Lima Giacobbo, B., Doorduyn, J., Klein, H. C., Dierckx, R. A. J. O., Bromberg, E., and de Vries, E. F. J. (2019) Brain-derived neurotrophic factor in brain disorders: focus on neuroinflammation, *Mol. Neurobiol.*, **56**, 3295-3312, doi: 10.1007/s12035-018-1283-6.
 36. Elkabes, S., Peng, L., and Black, I. B. (1998) Lipopolysaccharide differentially regulates microglial trk receptors and neurotrophin expression, *J. Neurosci Res.*, **54**, 117-122, doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19981001)54:1<117::AID-JNR12>3.0.CO;2-4.
 37. Miwa, T., Furukawa, S., Nakajima, K., Furukawa, Y., and Kohsaka, S. (1997) Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia, *J. Neurosci. Res.*, **50**, 1023-1029, doi: 10.1002/(SICI)1097-4547(19971215)50:6<1023::AID-JNR13>3.0.CO;2-5.
 38. Zhao, J., Bi, W., Xiao, S., Lan, X., Cheng, X., Zhang, J., Lu, D., Wei, W., Wang, Y., Li, H., Fu, Y., and Zhu, L. (2019) Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice, *Sci. Rep.*, **9**, 5790, doi: 10.1038/s41598-019-42286-8.
 39. Kamdi, S. P., Raval, A., and Nakhate, K. T. (2021) Phloridzin attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive impairment via antioxidant, anti-inflammatory and neuromodulatory activities, *Cytokine*, **139**, 155408, doi: 10.1016/j.cyto.2020.155408.
 40. Chowdhury, A. A., Gawali, N. B., Munshi, R., and Juvekar, A. R. (2018) Trigonelline insulates against oxidative stress, proinflammatory cytokines and restores BDNF levels in lipopolysaccharide induced cognitive impairment in adult mice, *Metab. Brain Dis.*, **33**, 681-691, doi: 10.1007/s11011-017-0147-5.

ACUTE AND CHRONIC LIPOPOLYSACCHARIDE-INDUCED STRESS CHANGES EXPRESSION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINE GENES IN THE RAT BRAIN REGION-SPECIFICALLY AND AFFECTS LEARNING AND MEMORY

M. I. Zaichenko*, P. Philenko, V. Sidorina, and G. A. Grigoryan

Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, 117485 Moscow, Russia; e-mail: mariya-zajchenko@yandex.ru

The purpose of the current work was a comparative analysis of the effects of acute and chronic lipopolysaccharide stress on behavior of rats in the Morris water maze and expression of mRNA proinflammatory cytokines and *BDNF* in different brain structures. The relevance of this study is related with a weak knowledge of the effects of acute and chronic stress on manifestation of cognitive brain functions, ambiguity of influences of both stresses on the hypothalamic-pituitary axis and expression of the proinflammatory cytokines genes, as well as contradictory data in the literature. In experiments on rats, the acute lipopolysaccharide (LPS) stress improved learning in the Morris water maze. For the period of learning, the rats swam on average less distance to reach a hidden platform and spent less time in the outer zone of the pool (tigmotaxis) and had a low speed compared to the control animals and a group of rats with chronic LPS stress. In a probe trial without a platform in the pool there were no significant differences between groups on time spent in the platform quadrant and distance swum. The acute stress produced a substantial increase of *TNF- α* and *IL-1 β* concentration in the hippocampus and amygdala, but not in the frontal cortex relative to the control animals. Although the chronic stress increased the levels of *TNF- α* and *IL-1 β* in the amygdala and hippocampus compared to the control groups, the significance between the groups was only marginal and the concentration of *BDNF* did not differ from the control animals in none of the structures mentioned. The concentration of *IL-6* marginally increased in acute LPS stress in the amygdala and marginally decreased chronic LPS stress in the hippocampus relative to the saline control groups. In total, the most clear molecular-biochemical changes occurred in the amygdala and hippocampus, where the increase of interleukines *TNF- α* and *IL-1 β* were seen in the acute and chronic LPS stress and no changes in *BDNF* concentration in the frontal cortex.

Keywords: learning, memory, water maze, lipopolysaccharide, acute and chronic stress, interleukines, BDNF, PCR, amygdala, hippocampus, frontal cortex

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ И ГАМКЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМ В ГИППОКАМПЕ КРЫСЫ ПОСЛЕ ОККЛЮЗИИ СРЕДНЕЙ МОЗГОВОЙ АРТЕРИИ И ЦЕНТРАЛЬНОГО ВВЕДЕНИЯ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА

© 2023 Т.С. Калинина¹, Г.Т. Шишкина^{1*}, Д.А. Ланшаков¹, Е.В. Сухарева¹, М.В. Онуфриев², Ю.В. Моисеева², Н.В. Гуляева², Н.Н. Дыгало¹

¹ ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН, 600090 Новосибирск, Россия; электронная почта: gtshi@bionet.nsc.ru

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

Поступила в редакцию 23.11.2022

После доработки 14.03.2023

Принята к публикации 14.03.2023

Среди ответов на ранних стадиях инсульта ключевое значение для развития постишемических функциональных последствий имеет активация нейродегенеративных и провоспалительных процессов в гиппокампе. Однако остается не вполне ясным, какие именно гены вовлечены в эти процессы. Целью данной работы было сравнительное исследование экспрессии генов, кодирующих транспортеры и рецепторы глутамата и ГАМК, а также маркеров воспаления в гиппокампе через сутки после двух видов ишемического воздействия (окклюзии средней мозговой артерии (МСаО) по модели Коизуми – МСаО-МК и по модели Лонга – МСаО-МЛ), а также после прямой провоспалительной активации центральным введением бактериального липополисахарида (LPS). Полученные результаты выявили различия и сходства между ответами на примененные в работе воздействия. После МСаО-МЛ и введения LPS обнаружено большее число изменивших экспрессию генов, связанных с активацией апоптоза и нейровоспаления, рецепцией глутамата, а также маркеров ГАМКергической системы, чем после МСаО-МК. В свою очередь, МСаО-МК и LPS характеризовались, по сравнению с МСаО-МЛ, изменением большего числа генов, вовлекаемых в транспорт глутамата. Наиболее ярко проявившимися отличиями МСаО-МЛ от МСаО-МК и LPS явились изменения в экспрессии генов кальмодулина и кальмодулин-зависимых киназ. Выявленные особенности ответов транскриптома гиппокампа на две модели ишемии в результате МСаО и прямой провоспалительный стимул будут способствовать дальнейшему пониманию причин и молекулярных механизмов, лежащих в основе разнообразия последствий инсультов как в модельных исследованиях, так и в клинике.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гиппокамп, окклюзия средней мозговой артерии, липополисахарид, глутамат, ГАМК, экспрессия генов.

DOI: 10.31857/S0320972523040097, **EDN:** ALGGNS

ВВЕДЕНИЕ

Острое нарушение кровоснабжения области мозга, преимущественно неокортекса, в результате ишемии в бассейне средней мозговой артерии в течение нескольких часов провоцирует гибель клеток и формирование очага инфаркта. Причиной этих событий считают нехватку питательных веществ и кислород-

ное голодание. Однако при ишемии погибают клетки и в «отдаленных» структурах мозга, таких как гиппокамп, непосредственно не получающие кровоснабжение по поврежденным сосудам [1]. Гиппокамп играет ключевую роль в контроле психоэмоционального состояния, обучения и памяти [2]. С дегенерацией нейронов этой структуры связывают развитие психопатологий, в том числе и постишемической

Принятые сокращения: LPS – липополисахарид; МСаО – окклюзия средней мозговой артерии; МСаО-МК – модель МСаО Коизуми; МСаО-МЛ – модель МСаО Лонга.

* Адресат для корреспонденции.

деменции [3]. Поэтому выяснение механизмов повреждающего влияния ишемии на гиппокамп важно для дальнейшего поиска средств ослабления негативных функциональных последствий ишемического воздействия. Нарушение кровотока по средней мозговой артерии считают причиной значительной части всех ишемических патологий мозга [4], поэтому окклюзию средней мозговой артерии (МСАО) используют для экспериментального моделирования ишемического инсульта на грызунах.

Среди предполагаемых путей провоцирования острой клеточной гибели после ишемии значительное внимание уделяется эксайтотоксическому действию глутамата [5, 6]. Однако глутаматергическая система вовлекается во множество жизненно важных функций организма [7], в том числе и в положительную регуляцию возбуждающими стимулами дифференцировки нейронов [8]. Неоднозначное влияние глутамата на разные процессы, определяющие жизнеспособность клеток, затрудняет выбор способов воздействия на эту систему для терапии вызванных ишемией повреждений, а также сроков их применения, например, для лигандов глутаматергических рецепторов. Так, накапливаются свидетельства, что увеличение экспрессии одних и тех же типов рецепторов глутамата в острой фазе инсульта может быть усугубляющим постишемическое восстановление, в то время как их увеличение в более поздней фазе, напротив, благоприятным [9]. Очевидно, что из-за неполного понимания роли отдельных компонентов глутаматергической системы в ишемическом повреждении мозга предпринимаемые попытки напрямую воздействовать на эту нейробиохимическую систему с целью предотвращения или замедления гибели клеток не всегда приводили к желаемым эффектам [10, 11].

Ишемическое повреждение мозга сопровождается нейровоспалением – активацией глиальных клеток, продукцией и секрецией цитокинов в гиппокампе [12]. В исследованиях патофизиологических механизмов нейродегенеративных заболеваний, индуцируемых в том числе и ишемией, введение липополисахарида (LPS) получило широкое распространение в качестве эффективного модельного подхода к оценке роли различных участников воспалительного процесса в этих заболеваниях [13]. Полногеномные анализы транскриптомов гиппокампа через сутки после экспериментальной ишемии [14, 15, 16] или центрального введения LPS [16, 17] выявили изменение экспрессии множества генов, в том числе генов регуляторов апоптоза, воспаления, нейро-

трансмиссивных систем. Новые сведения в данной области могут быть получены путем сравнения данных, полученных на разных моделях. Например, оказалось, что две наиболее часто используемые модели МСАО («золотой стандарт» моделирования ишемического инсульта на грызунах [18]) значительно различаются по ряду функциональных параметров, в том числе связанных с эксайтотоксичностью глутамата и воспалительными процессами [19, 20]. С учетом этих результатов целью данной работы было проведение сравнительного исследования экспрессии генов, кодирующих транспортеры и рецепторы глутамата и ГАМК, а также маркеров воспаления в гиппокампе после двух видов ишемического воздействия, модели МСАО Коизуми (МСАО-МК) [21] и модели Лонга (МСАО-ML) [22], а также после прямой провоспалительной активации путем центрального введения LPS. Недавно обнаружено, что модели ишемии по Коизуми и Лонга различаются по накоплению глюкокортикоидных гормонов и провоспалительных цитокинов в гиппокампе в остром периоде после ишемии [20], при этом различия сохраняются в течение месяцев [23]. Исследование особенностей провоспалительной активации, а также нарушений экспрессии генов глутаматергической системы и оценка возможных нарушений в других нейромедиаторных системах, прежде всего, тормозной ГАМКергической, принципиально важно для дальнейшего прояснения механизмов острого ишемического поражения гиппокампа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Влияние центрального введения LPS исследовали на взрослых самцах крыс линии Вистар, содержащихся в стандартных условиях вивария ИЦиГ СО РАН при температуре 22–24°C, световом режиме 14С/10Т и свободном доступе к воде и корму.

Влияние МСАО исследовали на взрослых самцах крыс линии Вистар, содержащихся в стандартных условиях вивария Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

Моделирование инсульта проводили по стандартным протоколам экспериментальной ишемии (модель Коизуми [20] и модель Лонга [21]), а также прямой провоспалительной активации путем центрального введения LPS.

Модель Коизуми (МСАО-МК). Под анестезией изофлураном выполняли разрез в области

шеи и, оттесняя мышечную ткань с левой стороны, накладывали лигатуры на общую сонную артерию, а также на наружную и внутреннюю сонные артерии. Нейлоновую нить (3-0) с закругленным концом вводили через отверстие в месте бифуркации на наружную и внутреннюю ветви и продвигали по внутренней сонной артерии до средней мозговой артерии. Затем затягивали лигатуру на внутренней сонной артерии для фиксации нити. Оклюзию проводили в течение 60 мин, при этом общая, наружная и внутренняя сонные артерии оставались перевязанными, а температура тела животного поддерживалась на уровне $37 \pm 0,5$ °С. Затем нить удаляли и затягивали лигатуру на внутренней сонной артерии. Контролем являлись ложнооперированные животные, с которыми выполняли все манипуляции, кроме введения нити.

Модель Лонга (МСаО-ML). Под анестезией изофлураном через разрез на шее животного лигировали общую сонную и наружную сонную артерии. После электрокоагуляции и диссекции фрагмента левой наружной сонной артерии через оставшуюся часть артерии вводили филамент из нейлоновой нити до пересечения со средней мозговой артерией. Оклюзия продолжалась в течение 60 мин, при этом температура тела крысы поддерживалась на уровне $37 \pm 0,5$ °С. Затем нить извлекали, что восстанавливало кровоток по ипсилатеральной общей сонной артерии. Контролем являлись ложнооперированные животные, с которыми выполняли все манипуляции, кроме введения нити.

В связи с необходимостью использования ткани мозга для анализа транскриптома в качестве подтверждения формирования ишемического очага у животных использовали оценку неврологических дефицитов, которая сопровождается формированием ишемического очага [20]. Использовали тест, основанный на 5-балльной поведенческой шкале, позволяющий оценить функциональное состояние контралатеральной передней лапы крыс, наличие поворотов и циркуляции в контралатеральную сторону и общую подвижность животных, а также тест на степень высовывания языка — по способности крысы вылизывать арахисовое масло из стеклянного цилиндра с последующим измерением расстояния от начала цилиндра до уровня оставшегося масла [20]. Все животные с МСаО, взятые в эксперимент, имели выраженные неврологические дефициты, свидетельствующие о формировании ишемического очага, в то время как ложнооперированные животные не демонстрирова-

ли таких дефицитов. По 5-балльной шкале все ложнооперированные животные имели балл 0, в то время как животные после МСаО в моделях Коизуми или Лонга демонстрировали тяжелый дефицит 4 балла во время операции и 3 балла — через сутки после операции перед забоем. Через сутки после операции животные с МСаО независимо от модели демонстрировали неспособность высунуть язык, в то время как у ложнооперированных крыс эта способность сохранялась на 92–100%. Следует отметить, что значения дефицитов в данной работе совпадают с таковыми через сутки после ишемии, представленными в предыдущих экспериментах [20].

Центральное введение LPS. Под анестезией изофлураном в правый стриатум вводили бактериальный эндотоксин липополисахарид (LPS) в дозе 30 мкг в 4 мкл физраствора по стереотаксическим координатам: AP = + 0,5 мм, ML = + 3 мм, DV = –4,5 мм [16] в течение 5 мин. Контрольным животным вводили в аналогичных условиях 4 мкл физраствора. LPS вводили в стриатум, поскольку он входит в число первоочередных повреждаемых ишемическим воздействием структур мозга. Например, у взрослых крыс 30-минутная МСаО по Коизуми вызывала повреждение, ограниченное полосатым телом, тогда как после этой МСаО в течение 2 ч наблюдались «инфаркты» как в стриатуме, так и в коре [24].

Секвенирование РНК. Через 24 ч после каждого из трех воздействий животных забивали декапитацией, на холоду выделяли гиппокамп, который помещали в раствор RNAlater («Life Technologies», США) и хранили при температуре –70 °С до секвенирования, которое выполняли в ООО «Геноаналитика» (<https://genoanalytica.ru>, Москва). Тотальную РНК выделяли из гиппокампа трех животных каждой экспериментальной и контрольной групп при помощи реагента Trizol («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Качество и количество выделенной тотальной РНК проверяли при использовании набора RNA 6000 Nano Kit («Agilent Technologies», США) на приборе BioAnalyzer («Agilent Technologies»). Фракцию полиА из тотальной РНК получали при помощи магнитных шариков олигоТ Dynabeads® mRNA Purification Kit («Thermo Fisher Scientific»). Далее из полиА-РНК были приготовлены библиотеки для массового параллельного секвенирования при помощи набора NEBNext® Ultra™ II RNA Library Prep («NEB», США), согласно инструкции к набору. Концентрацию библиотек определяли при помощи

набора Qubit dsDNA HS Assay Kit («Thermo Fisher Scientific») на приборе Qubit 2.0 («Thermo Fisher Scientific»). Распределение длин фрагментов библиотеки проводили при помощи набора Agilent High Sensitivity DNA Kit («Agilent Technologies»). Секвенирование проводили на приборе HiSeq1500 («Illumina», США) с генерацией не менее 10 млн коротких чтений длиной 50 нуклеотидов. Риды выравнивали на геном версии Rnor_6.0 при помощи программы STAR, и подсчет дифференциально экспрессирующихся генов проводили, используя пакет DESeq2.0.

ПЦР в реальном времени. Выявленные секвенированием изменения в экспрессии генов выборочно верифицировались методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе ViiA7 с применением технологии TaqMan («Thermo Fisher Scientific»). Выделение суммарной РНК, оценку ее качества и синтез кДНК проводили по ранее описанным стандартным протоколам [25]. Уровни экспрессии генов: *Casp3* (Rn00563902_m1), *IL1b* (Rn00580432_m1), *Slc1a2* (Rn00691548_m1), *Gria2* (Rn00568514_m1), *Glul* (Rn01483107_m1), *Gad2* (Rn00561244_m1) определяли в двух повторах в образцах РНК после секвенирования с добавлением до восьми образцов РНК из тех же экспериментальных групп. Все реакции проводили в соответствии с рекомендациями производителя, и уровень экспрессии генов рассчитывали по методу ddCt относительно экспрессии гена домашнего хозяйства бета-актина (Rn00667869_m1).

Статистическая обработка данных. Изменение экспрессии генов, определенное мето-

дом массового параллельного секвенирования транскриптома, считалось достоверным при скорректированном p -значении с поправкой на множественность сравнений (adjusted p -value – $padj$) меньшем, чем 0,05. При верификации уровня экспрессии методом ПЦР в реальном времени достоверность устанавливали путем прямых парных сравнений с использованием t -критерия Стьюдента в программе Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гены, ассоциированные с гибелью клеток.

Признаки гибели клеток в гиппокампе через сутки после перенесенных воздействий обнаружены после МСАО-ML, на что, по результатам секвенирования, указывало достоверное увеличение экспрессии гена дополнительной протеазы апоптоза каспазы-3 (*Casp3*) (рис. 1, а), подтвержденное методом ПЦР в реальном времени ($p < 0,05$; рис. 1, б). После всех воздействий – МСАО-ML, МСАО-МК и LPS – была также увеличена экспрессия гена *Casp4*. Кроме того, после LPS были достоверно увеличены экспрессии гена рецептора смерти *Fas*, *Casp1* и *Casp8* на уровне тенденции – p -value = 4,55E-03; $padj$ = 0,0946. Все эти гены были ассоциированы с выявленными в результате анализа геной онтологии биологическими процессами, такими как «апоптоз» («apoptotic process»), активация апоптоза нейронов («positive regulation of neuron apoptotic process»), активация процесса

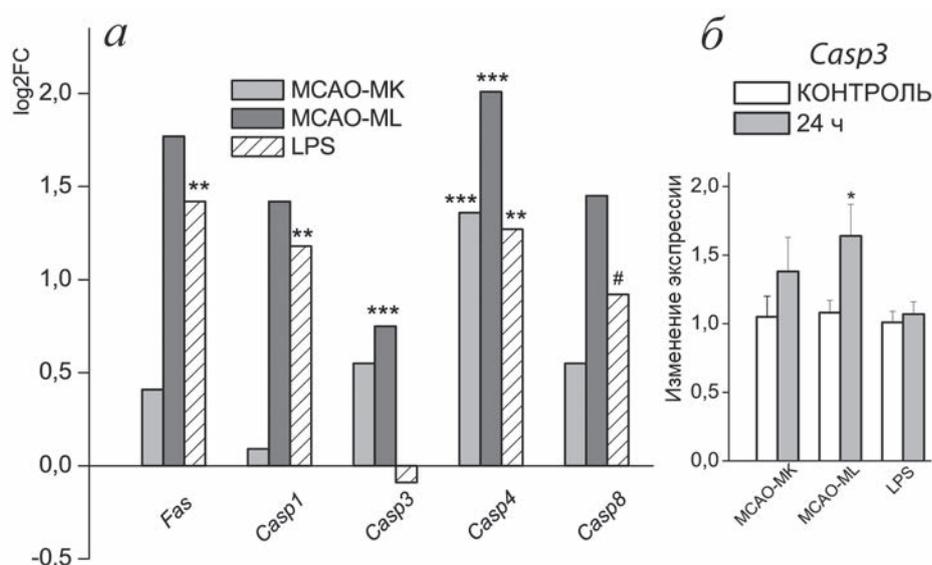


Рис. 1. Изменение экспрессии генов, ассоциированных с гибелью клеток, после двух типов ишемического воздействия и центрального введения LPS. а – По результатам секвенирования; ** $padj < 0,01$; *** $padj < 0,001$; # $padj < 0,1$. б – Верификация ПЦР в реальном времени; * $p < 0,05$

апоптоза («positive regulation of apoptotic process»), усиление гибели клеток («positive regulation of cell death»).

Следует, однако, отметить, что для оценки достоверности различий по результатам секвенирования был использован достаточно строгий критерий – различия считались достоверными лишь при $\text{padj} < 0,05$. Такой строгий отбор может, как отмечается большинством исследователей, приводить к потере генов, также реально изменивших экспрессию, но не на требуемом высоком уровне значимости. Из рис. 1 видно, что такими генами для МСАО-МЛ могут быть гены *Fas*, *Casp1* и *Casp8*, которые значительно изменили экспрессию по сравнению с соответствующими контрольными значениями, но только на уровне $p\text{-value} < 0,05$, в то время как значение padj не достигало достоверности.

Гены, ассоциированные с нейровоспалением.

Через сутки после обоих ишемических воздействий в гиппокампе была достоверно увеличена экспрессия гена *Gfap*, кодирующего маркерный белок астроцитов (рис. 2, а). Экспрессия *Aif* (гена маркерного белка микроглии Iba-1) была увеличена через сутки только после прямого провоспалительного воздействия – центрального введения LPS. По результатам секвенирования, экспрессия ни одного из генов ключевых провоспалительных цитокинов не была достоверно изменена после МСАО-МК, в то время как оба гена (*Il1b* и *Il6*) после МСАО-МЛ и один ген (*Il1b*) после LPS достоверно увеличили экспрессию через сутки после воздействия. Анализ экспрессии мРНК *Il1b* методом ПЦР в реальном времени

(рис. 2, б) верифицировал увеличение экспрессии гена интерлейкина после МСАО-МЛ и LPS, и, кроме того, показал достоверное повышение экспрессии гена *Il1b* и после МСАО-МК, выявленное по результатам секвенирования только на уровне $p\text{-value} = 0,0021$ ($\text{padj} > 1$). К списку провоспалительных маркеров был также добавлен ген *Mmp9*, экспрессия которого была также значительно увеличена через сутки после МСАО-МЛ и LPS.

Маркеры глутаматергической системы.

На рис. 3 представлено изменение экспрессий генов-маркеров глутаматергической системы, транспортеров и рецепторов: на рис. 3, а – по результатам секвенирования, на рис. 3, б – по результатам ПЦР-анализа.

Экспрессия генов ни одного из пяти известных в настоящее время переносчиков глутамата через клеточную мембрану не изменилась в гиппокампе через сутки после МСАО-МК или МСАО-МЛ. Прямая провоспалительная стимуляция центральным введением LPS привела к достоверному увеличению экспрессии гена одного из таких переносчиков – *Slc1a2* (рис. 3, а), этот эффект был подтвержден ПЦР-анализом ($p < 0,05$; рис. 3, б).

Ишемические воздействия не повлияли и на экспрессию в гиппокампе генов везикулярных транспортеров глутамата, в то время как после LPS было обнаружено достоверное снижение экспрессии гена *Slc17a6*.

Экспрессии генов двух транспортеров (*Slc1a4* и *Slc1a5*) нейтральных аминокислот, в их числе также глутамин и глутамат, были достоверно увеличены после МСАО-МК и LPS. После МСАО-МЛ достоверно была увеличена

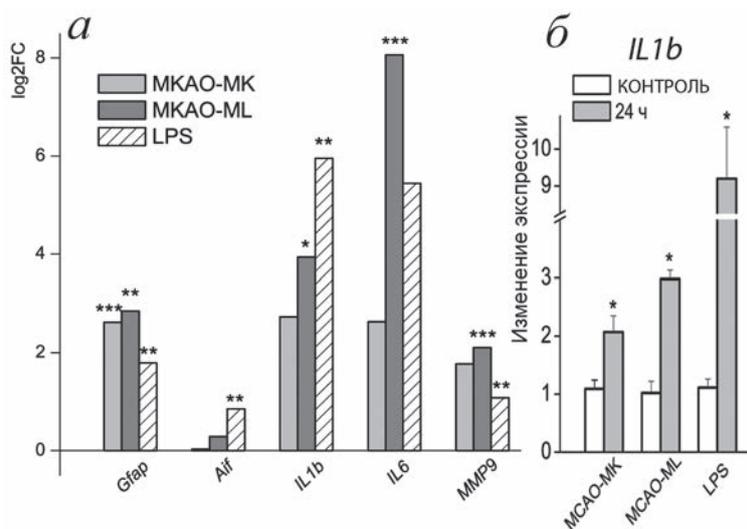


Рис. 2. Изменение экспрессии генов, ассоциированных с нейровоспалением, после двух типов ишемического воздействия и центрального введения LPS. а – По результатам секвенирования; * $\text{padj} < 0,05$; ** $\text{padj} < 0,01$; *** $\text{padj} < 0,001$. б – Верификация ПЦР в реальном времени; * $p < 0,05$

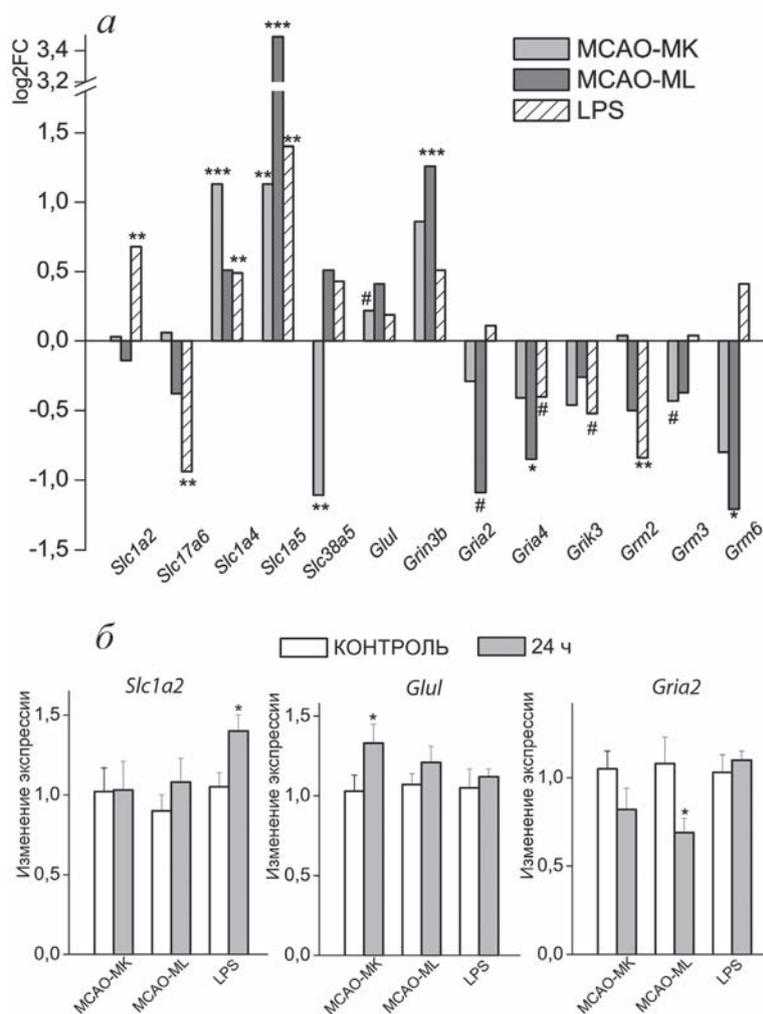


Рис. 3. Изменение экспрессии генов-маркеров глутаматергической системы после двух типов ишемического воздействия и центрального введения LPS. *а* – По результатам секвенирования; * $p_{adj} < 0,05$; ** $p_{adj} < 0,01$; *** $p_{adj} < 0,001$; # $p_{adj} < 0,1$. *б* – Верификация ПЦР в реальном времени; * $p < 0,05$

экспрессия только *Slc1a5*. После МСАО-МК экспрессия еще одного транспортера нейтральных аминокислот (*Slc38a5*) была снижена. Эти результаты указывают на изменение обмена глутамина и глутамата в гиппокампе после как ишемических, так и прямых провоспалительных воздействий. На такую возможность указывает увеличение после МСАО-МК экспрессии гена *Glul* (катализирует синтез глутамина из глутамата), подтвержденное ПЦР в реальном времени ($p < 0,05$).

Рецепторы глутамата представлены у млекопитающих ионотропными и метаботропными типами. Ионотропные рецепторы (NMDA, AMPA и каинатные) являются гетеротетрамерными трансмембранными каналами, пропускающими в клетку при активации нейротрансмиттером положительно заряженные ионы кальция или натрия. Каждая субъединица кодируется отдельным геном, и субъединичный состав тетрамера определяет функцио-

нальные свойства рецептора. Метаботропные рецепторы глутамата, каждый из которых кодируется отдельным геном, относятся к суперсемейству рецепторов, сопряженных с гуанин-связывающими белками – GPCR.

После МСАО-МК обнаружено изменение (снижение) на уровне тенденции (p -value = 0,0023; $p_{adj} = 0,0679$) экспрессии гена только одного рецептора – метаботропного *Grm3*.

МСАО-ML привела через сутки к изменениям в экспрессии как ионотропных, так и метаботропных рецепторов. Среди субъединиц ионотропных AMPA-рецепторов достоверное снижение по результатам секвенирования обнаружено для гена *Gria4*. Снижение, по результатам секвенирования, только на уровне тенденции (p -value = 0,0272; $p_{adj} = 0,1437$) экспрессии гена другой субъединицы AMPA-рецепторов – *Gria2*, показало достоверный эффект ($p < 0,05$) при определении методом ПЦР в реальном времени. В отличие от снизивших

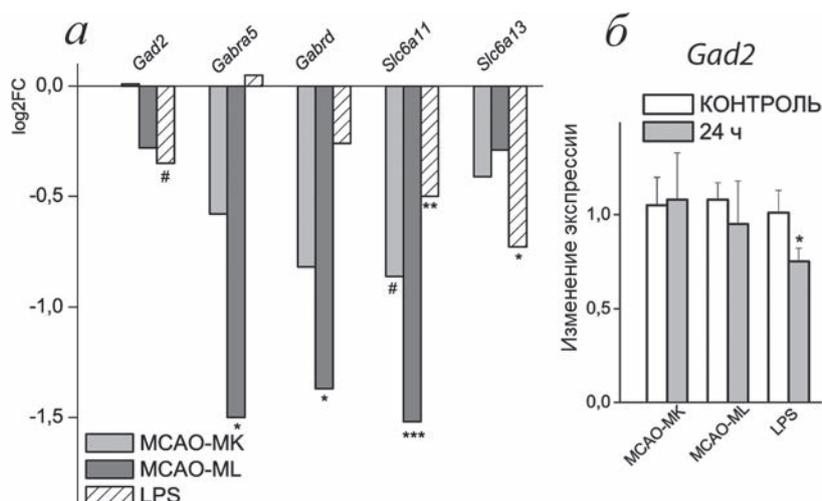


Рис. 4. Изменение экспрессии генов-маркеров ГАМКергической системы после двух типов ишемического воздействия и центрального введения LPS. *а* – По результатам секвенирования; * $p_{adj} < 0,05$; ** $p_{adj} < 0,01$; *** $p_{adj} < 0,001$; # $p_{adj} < 0,1$. *б* – Верификация ПЦР в реальном времени; * $p < 0,05$

экспрессию генов, кодирующих субъединицы AMPA-рецепторов, экспрессия гена субъединицы *Grin3b* ионотропных NMDA-рецепторов была достоверно повышена. Помимо ионотропных AMPA-рецепторов, после МСАО-ML обнаружено также достоверное снижение экспрессии гена метаботропного рецептора *Grm6*.

Через сутки после введения LPS, так же, как и после МСАО-ML, была снижена, но только на уровне тенденции (p -value = 0,0022; $p_{adj} = 0,0531$) экспрессия гена *Gria4*, кодирующего субъединицу AMPA-рецепторов. Также только на уровне тенденции (p -value = 0,0033; $p_{adj} = 0,0734$) после введения LPS была снижена экспрессия гена *Grik3*, кодирующего субъединицу каинатных рецепторов. После введения LPS снижение экспрессии гена метаботропного рецептора *Grm2* достигало достоверного уровня.

Маркеры ГАМКергической нейротрансмиссии. Гены ГАМКергической системы, изменившие экспрессию после воздействий, представлены на рис. 4, *а*. После всех воздействий в гиппокампе снизилась экспрессия гена *Slc6a11*: на уровне тенденции (p -value = 0,0038; $p_{adj} = 0,0932$) после МСАО-МК и достоверно – после МСАО-ML и LPS. Экспрессия гена другого транспортера ГАМК – *Slc6a13*, а также гена фермента синтеза ГАМК *Gad2* (p -value = 0,0041; $p_{adj} = 0,0871$) снизились только после введения LPS. Верификация изменения *Gad2*, подтвержденная ПЦР в реальном времени, показала достоверность снижения после LPS (рис. 4, *б*). После МСАО-ML достоверно снизились экспрессии генов ГАМКергических рецепторов – *Gabra5* и *Gabrd* (рис. 4, *а*).

Кальций/кальмодулин-зависимые протеинкиназы. Важную роль в активности глутаматергических и ГАМКергических рецепторов играют Ca^{2+} /кальмодулин-зависимые киназы или CaM-киназы. По результатам секвенирования выявлено снижение экспрессии генов *Camkk1*, *Camkk2*, *Calm1* и *Camk4* – после МСАО-ML (рис. 5). После МСАО-МК обнаружено снижение экспрессии только одного из этих генов – *Camkk1*, а после LPS не была изменена экспрессия ни одного из этих генов.

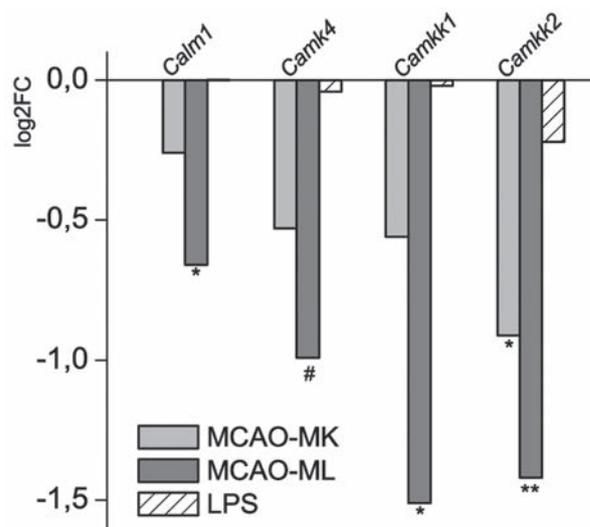


Рис. 5. Изменение экспрессии генов кальмодулина и кальмодулин-зависимых протеинкиназ после двух типов ишемического воздействия и центрального введения LPS (по результатам секвенирования). * $p_{adj} < 0,05$; ** $p_{adj} < 0,01$; # $p_{adj} < 0,1$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее мы предположили, что фокальные ишемические поражения мозга могут вызывать вторичные, дистантные (расположенные на расстоянии от первичного очага) повреждения гиппокампа, реализуемые иными механизмами. По-видимому, отложенные последствия фокального повреждения мозга, выражающиеся клинически в когнитивных и эмоциональных расстройствах, независимо от размера и локализации первичного повреждения связаны с опосредованными глюкокортикоидами и ассоциированными с нейровоспалением изменениями в гиппокампе – структуре, селективно чувствительной к различным экстремальным воздействиям [26, 27]. Действительно, гиппокамп, несмотря на отсутствие в нем зоны инфаркта, относят к структурам мозга, наиболее уязвимым в постишемический период [3].

МСАО-МЛ и МСАО-МК – 2 популярные и наиболее часто применяемые в предклинических исследованиях модели инсульта. При этом метаанализ немногочисленных сравнительных исследований этих моделей на грызунах показывает, что данные о сходстве и различиях этих моделей противоречивы, зависят от используемого вида (мыши, крысы), конкретного времени ишемии и наличия или отсутствия реперфузии [28]. Это касается данных об объеме инфаркта, смертности и неврологическом дефиците. В наших предыдущих исследованиях на этих моделях на крысах не удалось найти достоверные различия в объеме инфаркта мозга, оцененном через 72 ч после МСАО с использованием стандартного метода окраски митохондриальным красителем 2,3,5-трифенил тетразолий хлоридом (ТТС) [20]. Не обнаружено также достоверных различий в развитии неврологических дефицитов в первые 14 дней после МСАО и в выживаемости животных [20, 23]. Отсутствие различий в неврологических дефицитах между двумя моделями косвенно подтверждает и сходный объем инфаркта мозга, поскольку между этими показателями существует прямая зависимость [29]. Несмотря на то что при моделировании МСАО-МЛ и МСАО-МК на крысах ишемический очаг ограничивается областями неокортекса и стриатума [20], экспериментально было показано, что имеются достоверные различия связывания кортикостерона в гиппокампе и фронтальной коре (вне зоны первичного ишемического повреждения) не только в остром периоде [20], но и даже через 3 месяца после ишемии МСАО [23]. Важно отметить, что и в клиническом про-

спективном исследовании нам удалось показать независимость развития постинсультных кортизол-зависимых когнитивных и депрессивных расстройств от неврологических дефицитов (косвенно свидетельствующих о размерах ишемического очага), которые отражают развитие первичного ишемического очага в бассейне средней мозговой артерии [30].

В данной работе уже через сутки после МСАО-МЛ обнаружены признаки активации апоптоза клеток, на что указывало увеличение экспрессии гена исполнительной протеазы апоптоза каспазы-3. Этот эффект согласуется с результатами предшествующих работ о появлении первых признаков гибели клеток в гиппокампе в первые дни после ишемии/реперфузии [19, 31, 32]. Гибель нейрональных клеток может вызывать воспалительный процесс, однако индуцированное воспаление, в свою очередь, может приводить к дальнейшей гибели клеток [33]. Поэтому не удивительно, что прямое воздействие провоспалительным стимулом – бактериальным эндотоксином – приводило через сутки к увеличению в гиппокампе не только экспрессии гена *Aif* – гена маркерного белка активированной микроглии *Iba-1*, но и гена рецептора смерти *Fas*.

Нейровоспаление проявляется как активацией глиальных клеток, так и увеличением продукции провоспалительных цитокинов. Наиболее быструю активацию после ишемии отмечают у астроцитов. Двухчасовая МСАО сопровождалась через сутки значительным увеличением числа активированных астроцитов в гиппокампе крыс, в то время как заметной активации микроглиальных клеток в этот период не наблюдалось [34]. С этими результатами полностью согласуются наши данные об увеличении в гиппокампе экспрессии гена маркерного белка астроцитов *Gfap* и отсутствие изменений в экспрессии гена *Aif* через 24 ч после обоих ишемических воздействий. Ишемия/реперфузия повышает проницаемость гематоэнцефалического барьера, благодаря чему к секреции провоспалительных цитокинов активированными глиальными клетками подключаются также мигрировавшие из периферической крови лимфоциты [35]. Интересно, что после МСАО по методу Лонга увеличению экспрессии гена матриксной металлопротеиназы-9 (*MMP9*), вовлекаемой в нарушение проницаемости барьера [36], сопутствовала более выраженная у этой модели провоспалительная активация. По результатам секвенирования, после МСАО-МЛ были достоверно увеличены экспрессии генов двух ключевых провоспалительных цитокинов – *Il1b* и *Il6*,

в то время как достоверное увеличение экспрессии лишь одного из них, *Il1b*, было выявлено после МСАО-МК лишь ПЦР-анализом. Эти данные в значительной степени подтверждают результаты работы Smith et al. [18], которые свидетельствуют о достоверно более выраженных провоспалительных процессах у мышей с МСАО-ML в сравнении с МСАО-МК.

Значительную роль в нейродегенеративных эффектах ишемии отводят глутаматергической эксайтотоксичности, которую связывают с накоплением глутамата в экстраклеточном пространстве и гиперактивацией глутаматных рецепторов [5, 37, 38], логически обусловивших представление, что ослабление этих событий является благоприятным для смягчения клеточной гибели [39]. Действительно, экспериментальная индукция ишемии с помощью широко используемого метода, в том числе и в нашей работе – окклюзии средней мозговой артерии – буквально с первых минут вызывает быстрое увеличение уровня внеклеточного глутамата в гиппокампе [40, 41]. Это острое увеличение уровня внеклеточного глутамата в структуре, однако, также быстро нормализуется, что, очевидно, обеспечивается работой специфических переносчиков нейромедиатора через клеточную мембрану. В настоящее время описано 5 типов таких переносчиков [42], которые переносят высвободившийся глутамат в астроциты, где он под действием глутаматсинтазы превращается в глутамин. Далее белки-переносчики глутамин на плазматической мембране астроцитов и нейронов опосредуют перенос глутамин от астроцитов к нейронам, где под действием глутаминазы глутамин превращается в глутамат, который с помощью везикулярных транспортеров глутамата загружается в синаптические везикулы для дальнейшего использования. Полагают, что более половины глутамата образуется в результате такого глутамато-глутаминового цикла между нейронами и астроцитами [43]. Несмотря на быструю нормализацию острого повышения уровня экстраклеточного глутамата, выяснилось, что ишемия мозга может вызывать длительные изменения в регуляторах глутаматергической нейротрансмиссии, что, в свою очередь, может обуславливать отсроченные изменения как в активности нейротрансмиссии, так и в связанных с нею функциях.

Примененные нами ишемические воздействия приводили через сутки к повышению в гиппокампе экспрессии генов транспортеров нейтральных аминокислот, *Slc1a4* и *Slc1a5*, что может указывать на изменение обмена глута-

мина и глутамата в гиппокампе после ишемии. Увеличение экспрессии гена *Slc1a5* согласуется с обнаруженными нами ранее изменениями после LPS и инсульта по методу Коизуми [16] и расширяет этот эффект ишемии и для модели Лонга. Предположение о связи повышенной экспрессии транспортеров нейтральных аминокислот с возможным изменением обмена глутамин и глутамата косвенно подтверждается увеличением экспрессии гена глутаминсинтетазы *Glul* после МСАО-МК, характеризующейся изменением экспрессии обоих транспортеров. Прямая провоспалительная стимуляция центральным введением LPS привела к достоверному увеличению экспрессии гена переносчика глутамата через клеточную мембрану *Slc1a2* и снижению экспрессии гена везикулярного транспортера *Slc17a6*. Экспрессии генов транспортеров этих типов не были изменены через сутки после обеих ишемий.

Действие глутамата осуществляется через ионотропные и метаботропные глутаматные рецепторы, экспрессии генов которых изменялись через сутки после примененных нами воздействий. Более выраженные изменения наблюдались после МСАО-ML и LPS, которые, как показано выше, приводили к большему провоспалительному ответу, чем МСАО-МК, что, учитывая локализацию глутаматных рецепторов на глиальных клетках [44], являются дополнительным свидетельством взаимодействия ответов глутаматергической и провоспалительной систем. После МСАО-ML и LPS, но не после МСАО-МК в гиппокампе наблюдалось снижение экспрессии гена *Gria4*, кодирующего субъединицу AMPA-рецепторов. Эти результаты согласуются со снижением экспрессии белка AMPA-рецепторов в гиппокампе крыс, обнаруженным через сутки после перманентной окклюзии средней мозговой артерии, обычной или отягощенной диабетическим состоянием [19]. В этой работе было также обнаружено различие в ответах глутаматных рецепторов на тип ишемического воздействия – изменений в экспрессии белка AMPA-рецепторов в гиппокампе крыс не было выявлено через 24 ч после транзиторной ишемии.

После МСАО-ML обнаружено увеличение экспрессии гена *Grin3b*, кодирующего субъединицу NMDA-рецепторов, изменения которого не обнаружено ни после МСАО-МК, ни после LPS. Обнаруженное увеличение может отражать либо развитие у животных посттравматического стрессового расстройства [45], либо, напротив, более раннюю после МСАО-ML активацию восстанавливающих процессов. Относительно второй возможности следует

отметить, что эксайтотоксическую гибель нейронов после ишемического повреждения связывают, прежде всего, с гиперактивацией NMDA-рецепторов, однако клинические испытания антагонистов этих рецепторов не только не улучшали, но даже усугубляли повреждение головного мозга [10]. В отличие от антагонистов, агонисты в острый период после инсульта через модулирующий «сайт глицина» NMDA оказывались более «полезными» для восстановления [11]. мРНК *Grin3b* широко распространена в мозге взрослых крыс [46], а комбинация субъединиц NR1/NR3B (*Grin1/Grin3b*) может представлять собой тип возбуждающего глицинового рецептора [47]. Однако прояснение роли субъединицы *Grin3b* NMDA-рецепторов в постишемический период требует специальных исследований.

Все три примененных в работе воздействия приводили к снижению экспрессии генов метаботропных рецепторов, но если после МСАО-МК это был ген *Grm3*, то после МСАО-ML – *Grm6*, а после LPS – *Grm2*. *Grm3* и *Grm2* относятся ко второй группе метаботропных рецепторов, в то время как *Grm6* – к третьей. Стимуляция метаботропных рецепторов третьей группы, экспрессирующихся на микроглиальных клетках, трансформирует микроглию в нейропротективный фенотип, в то время как стимуляция рецепторов второй группы, особенно mGluR2 (*Grm2*) – в нейротоксический фенотип, проявляющийся высвобождением Fas-лиганда и запуском апоптоза через активацию каспазы-3 [45]. После МСАО мыши-нокауты по *Grm2* демонстрировали меньший объем поражения и ускорение поведенческого восстановления [48]. Различные эффекты МСАО-МК и МСАО-ML на экспрессию компонентов глутаматергической системы могут быть ассоциированы с различной аккумуляцией кортикостерона в гиппокампе в этих моделях [20, 23], потому что глюкокортикоидные гормоны являются регуляторами практически всех компонентов этой системы [49], а также контролируют развитие гиперглутаматергической трансмиссии [50], результатом которой является развитие эксайтотоксичности.

Помимо усиления глутаматергического сигнала, нарушение угнетающего влияния ГАМК на возбудимость нейронов также вносит вклад в ухудшение состояния после инсульта [51]. Примененные в работе воздействия повлияли на экспрессию маркеров ГАМКергической системы. Общим ответом на все воздействия было снижение экспрессии гена транспортера ГАМК *Slc6a11*. Кроме того,

после МСАО-ML были также снижены экспрессии генов ГАМКергических рецепторов – *Gabra5* и *Gabrd*.

Хотя проверка в качестве нейрозащитных агентов препаратов, нацеленных на NMDA-рецепторы, потерпела в клинических испытаниях неудачу, имеются отдельные свидетельства смягчения вызываемых ими негативных побочных эффектов через влияние на сигнальный каскад ниже стимуляции рецепторов [52]. Перспективным может быть также путь воздействия на активность ГАМКергических рецепторов через сигнальные пути рецепторов и регуляторы синаптической пластичности, к которым принадлежат, в частности, белковые продукты генов *Camkk1* и *Camkk2*, изменивших экспрессию после МСАО-ML. В недавней работе было показано, что восстановление сниженной ишемией экспрессии рецепторов ГАМК путем блокады механизма их взаимодействия с СаМКII, фосфорилируемой *Camkk1* и *Camkk2*, ингибировало эксайтотоксическую гибель нейронов [53], что, по мнению авторов, может значительно расширить фармакологические возможности торможения прогрессирующей гибели нейронов после ишемического инсульта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В целом, полученные результаты показывают как различие, так и сходство между ответами на примененные в работе воздействия (таблица). Животные после МСАО-ML демонстрировали большее число изменивших экспрессию генов, связанных с активацией апоптоза и нейровоспаления, рецепцией глутамата, а также маркерами ГАМКергической системы, чем МСАО-МК, и были ближе в этом плане к ответам, индуцированным центральным введением LPS. В свою очередь, по сравнению с МСАО-ML, МСАО-МК и LPS характеризовались изменением большего числа генов, вовлекаемых в транспорт глутамата. Наиболее ярко проявившимся отличием МСАО-ML от МСАО-МК и введения LPS явились обнаруженные после этого типа ишемического воздействия изменения в экспрессии генов кальмодулина и кальмодулин-зависимых киназ. Выявленные особенности ответов транскриптома гиппокампа на две модели МСАО и прямой провоспалительный стимул будут способствовать дальнейшему пониманию причин и молекулярных механизмов, лежащих в основе разнообразия последствий инсультов, как в модельных исследованиях, так и в клинике.

Изменение экспрессии генов в гиппокампе после окклюзии средней мозговой артерии или центрального введения липополисахарида по скорректированному *p*-значению (*padj*)

Процесс	Ген	МСАО-МК	МСАО-МЛ	LPS
Апоптоз	<i>Fas</i>	≈	≈	↑**
	<i>Casp1</i>	≈	≈	↑**
	<i>Casp3</i>	≈	↑***	≈
	<i>Casp4</i>	↑***	↑***	↑**
	<i>Casp8</i>	≈	≈	↑#
Нейровоспаление	<i>Gfap</i>	↑***	↑***	↑**
	<i>Aif (IBA1)</i>	≈	≈	↑**
	<i>Il1b</i>	≈	↑*	↑**
	<i>Il6</i>	≈	↑***	≈
	<i>MMP9</i>	≈	↑***	↑**
Маркеры глутаматергической системы	<i>Slc1a2</i>	≈	≈	↑**
	<i>Slc17a6</i>	≈	≈	↓**
	<i>Slc1a4</i>	↑***	≈	↑**
	<i>Slc1a5</i>	↑**	↑***	↑**
	<i>Slc38a5</i>	↓**	≈	≈
	<i>Glul</i>	↑#	≈	≈
	<i>Grin3b</i>	≈	↑***	≈
	<i>Gria2</i>	≈	↓#	≈
	<i>Gria4</i>	≈	↓*	↓#
	<i>Grik3</i>	≈	≈	↓#
	<i>Grm2</i>	≈	≈	↓**
	<i>Grm3</i>	↓#	≈	≈
	<i>Grm6</i>	≈	↓*	≈
Маркеры ГАМКергической системы	<i>Gad2</i>	≈	≈	↓#
	<i>Gabra5</i>	≈	↓*	≈
	<i>Gabrd</i>	≈	↓*	≈
	<i>Slc6a11</i>	↓#	↓***	↓**
	<i>Slc6a13</i>	≈	≈	↓*
CaM-киназы	<i>Calm1</i>	≈	↓*	≈
	<i>Camk4</i>	≈	↓#	≈
	<i>Camkk1</i>	≈	↓*	≈
	<i>Camkk2</i>	↓*	↓**	≈

Примечание. Обозначения: ↑↓ – достоверное увеличение или снижение; ≈ – отсутствие достоверных изменений; * *padj* < 0,05; ** *padj* < 0,01; *** *padj* < 0,001; # *padj* < 0,1; серым цветом выделены гены, экспрессия которых верифицирована методом ПЦР в реальном времени.

Ограничения работы. Основной задачей данной работы было исследование раннего транскрипционного ответа гиппокампа на окклюзию средней мозговой артерии при использовании двух моделей МСАО; для этого производили выделение гиппокампа через 24 ч после ишемии или ложной операции. Дизайн эксперимента не позволял провести прямую оценку ишемического очага у экспериментальных животных и межгрупповое сравнение, однако результаты физиологического тестирования, представленные в работе, позволяют, хотя и косвенно, но достаточно адекватно оценить наличие очагов по развитию неврологического дефицита. Данные использованных методов оценки неврологического дефицита, как было показано ранее, коррелируют с объемом ишемического очага [29].

Вклад авторов. Н.В. Гуляева и Г.Т. Шишкина – концепция и руководство работой; Т.С. Калинина, Д.А. Ланшаков, Е.В. Сухарева, М.В. Онуфриев и Ю.В. Моисеева – проведение экспериментов; Н.В. Гуляева, Г.Т. Шишкина, Т.С. Калинина, Н.Н. Дыгало – обсуждение результатов исследования; Г.Т. Шишкина – на-

писание текста; Н.В. Гуляева, Т.С. Калинина и Н.Н. Дыгало – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-64-47013), а также направленного исключительно на содержание и уход экспериментальных животных бюджетного проекта № FWNR-2022-0023.

Благодарности. Благодарим ООО «Гено-аналитика» (Москва, Россия) за секвенирование образцов и первичный биоинформатический анализ. Благодарим В.Н. Бабенко за первичный биоинформатический анализ данных после введения липополисахарида.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все проводимые исследования выполнялись в соответствии с Международными стандартами по работе с лабораторными животными, согласно Директиве 86/609/ЕЕС и рекомендациям Комиссии по биоэтике ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН (Протокол № 115 от 20.12.2021 г.), а также по протоколам, утвержденным Комиссией по биоэтике Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rudolph, M., Schmeer, C. W., Günther, M., Woitke, F., Kathner-Schaffert, C., Karapetow, L., Lindner, J., Lehmann, T., Jirikowski, G., Witte, O. W., Redecker, C., and Keiner, S. (2021) Microglia-mediated phagocytosis of apoptotic nuclei is impaired in the adult murine hippocampus after stroke, *Glia*, **69**, 2006-2022, doi: 10.1002/glia.24009.
- Rolls, E. T. (1996) A theory of hippocampal function in memory, *Hippocampus*, **6**, 601-620, doi: 10.1002/(SICI)1098-1063(1996)6:6<601::AID-HIPO5>3.0.CO;2-J.
- Gulyaeva, N. V., Onufriev, M. V., and Moiseeva, Y. V. (2021) Ischemic stroke, glucocorticoids, and remote hippocampal damage: a translational outlook and implications for modeling, *Front. Neurosci.*, **15**, 781964, doi: 10.3389/fnins.2021.781964.
- Robinson, R. G., and Jorge, R. E. (2016) Post-stroke depression: a review, *Am. J. Psychiatry*, **173**, 221-231, doi: 10.1176/appi.ajp.2015.15030363.
- Globus, M. Y., Busto, R., Martinez, E., Valdes, I., Dietrich, W. D., and Ginsberg, M. D. (1991) Comparative effect of transient global ischemia on extracellular levels of glutamate, glycine, and gamma-aminobutyric acid in vulnerable and nonvulnerable brain regions in the rat, *J. Neurochem.*, **57**, 470-478, doi: 10.1111/j.1471-4159.1991.tb03775.x.
- Luo, Y., Ma, H., Zhou, J. J., Li, L., Chen, S. R., Zhang, J., Chen, L., and Pan, H. L. (2018) Focal cerebral ischemia and reperfusion induce brain injury through $\alpha 2\delta$ -1-bound NMDA receptors, *Stroke*, **49**, 2464-2472, doi: 10.1161/STROKEAHA.118.022330.
- Magi, S., Piccirillo, S., and Amoroso, S. (2019) The dual face of glutamate: from a neurotoxin to a potential survival factor-metabolic implications in health and disease, *Cell. Mol. Life Sci.*, **76**, 1473-1488, doi: 10.1007/s00018-018-3002-x.
- Deisseroth, K., Singla, S., Toda, H., Monje, M., Palmer, T. D., and Malenka, R. C. (2004) Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells, *Neuron*, **42**, 535-552, doi: 10.1016/s0896-6273(04)00266-1.
- Hu, J., Li, C., Hua, Y., Liu, P., Gao, B., Wang, Y., and Bai, Y. (2020) Constraint-induced movement therapy improves functional recovery after ischemic stroke and its impacts on synaptic plasticity in sensorimotor cortex and hippocampus, *Brain Res. Bull.*, **160**, 8-23, doi: 10.1016/j.brainresbull.2020.04.006.
- Ikonomidou, C., and Turski, L. (2002) Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? *Lancet Neurol.*, **1**, 383-386, doi: 10.1016/s1474-4422(02)00164-3.

11. Biegon, A., Liraz-Zaltsman, S., and Shohami, E. (2018) Stimulation of N-methyl-D-aspartate receptors by exogenous and endogenous ligands improves outcome of brain injury, *Curr. Opin. Neurol.*, **31**, 687-692, doi: 10.1097/WCO.0000000000000612.
12. Shishkina, G. T., Kalinina, T. S., Gulyaeva, N. V., Lanshakov, D. A., and Dygalo, N. N. (2021) Changes in gene expression and neuroinflammation in the hippocampus after focal brain ischemia: involvement in the long-term cognitive and mental disorders, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 657-666, doi: 10.1134/S0006297921060043.
13. Batista, C. R. A., Gomes, G. F., Candelario-Jalil, E., Fiebich, B. L., and de Oliveira, A. C. P. (2019) Lipopolysaccharide-induced neuroinflammation as a bridge to understand neurodegeneration, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2293, doi: 10.3390/ijms20092293.
14. Chung, J. Y., Yi, J. W., Kim, S. M., Lim, Y. J., Chung, J. H., and Jo, D. J. (2011) Changes in gene expression in the rat hippocampus after focal cerebral ischemia, *J. Korean Neurosurg. Soc.*, **50**, 173-178, doi: 10.3340/jkns.2011.50.3.173.
15. Wang, C., Liu, M., Pan, Y., Bai, B., and Chen, J. (2017) Global gene expression profile of cerebral ischemia-reperfusion injury in rat MCAO model, *Oncotarget*, **8**, 74607-74622, doi: 10.18632/oncotarget.20253.
16. Shishkina, G. T., Gulyaeva, N. V., Lanshakov, D. A., Kalinina, T. S., Onufriev, M. V., Moiseeva, Y. V., Sukhareva, E. V., and Babenko, V. N. (2021) Identifying the involvement of pro-inflammatory signal in hippocampal gene expression changes after experimental ischemia: transcriptome-wide analysis, *Biomedicines*, **9**, 1840, doi: 10.3390/biomedicines9121840.
17. Bonow, R. H., Aid, S., Zhang, Y., Becker, K. G., and Bosetti, F. (2009) The brain expression of genes involved in inflammatory response, the ribosome, and learning and memory is altered by centrally injected lipopolysaccharide in mice, *Pharmacogenomics J.*, **9**, 116-126, doi: 10.1038/tpj.2008.15.
18. Smith, H. K., Russell, J. M., Granger, D. N., and Gavins, F. N. (2015) Critical differences between two classical surgical approaches for middle cerebral artery occlusion-induced stroke in mice, *J. Neurosci. Methods*, **249**, 99-105, doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.04.008.
19. Shah, F. A., Li, T., Kury, L. T. A., Zeb, A., Khatoon, S., Liu, G., Yang, X., Liu, F., Yao, H., Khan, A.-U., Koh, P. O., Jiang, Y., and Li, S. (2019) Pathological comparisons of the hippocampal changes in the transient and permanent middle cerebral artery occlusion rat models, *Front. Neurol.*, **10**, 1178, doi: 10.3389/fneur.2019.01178.
20. Onufriev, M. V., Moiseeva, Y. V., Zhanina, M. Y., Lazareva, N. A., and Gulyaeva, N. V. (2021) A comparative study of Koizumi and Longa methods of intraluminal filament middle cerebral artery occlusion in rats: early corticosterone and inflammatory response in the hippocampus and frontal cortex, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 13544, doi: 10.3390/ijms222413544.
21. Koizumi, J. Y., Nakazawa, T., and Ooneda, G. (1986) Experimental studies of ischemic cerebral edema. I. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation in the ischemic area can be introduced, *Jpn. J. Stroke*, **8**, 1-8, doi: 10.3995/jstroke.8.1.
22. Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S., and Cummins, R. (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats, *Stroke*, **20**, 84-91, doi: 10.1161/01.str.20.1.84.
23. Onufriev, M. V., Stepanichev, M. Y., Moiseeva, Y. V., Zhanina, M. Y., Nedogreeva, O. A., Kostryukov, P. A., Lazareva, N. A., and Gulyaeva, N. V. (2022) A comparative study of two models of intraluminal filament middle cerebral artery occlusion in rats: long lasting accumulation of corticosterone and interleukins in the hippocampus and frontal cortex in Koizumi model, *Biomedicines*, **10**, 3119, doi: 10.3390/biomedicines10123119.
24. Arvidsson, A., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2001) N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke, *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 10-18, doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01611.x.
25. Dygalo, N. N., Bannova, A. V., Kalinina, T. S., and Shishkina, G. T. (2004) Clonidine increases caspase-3 mRNA level and DNA fragmentation in the developing rat brainstem, *Dev. Brain Res.*, **152**, 225-231, doi: 10.1016/j.devbrainres.2004.06.018.
26. Gulyaeva, N. V. (2019) Biochemical mechanisms and translational relevance of hippocampal vulnerability to distant focal brain injury: the price of stress response, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1306-1328, doi: 10.1134/S0006297919110087.
27. Gulyaeva, N. V. (2019) Functional neurochemistry of the ventral and dorsal hippocampus: stress, depression, dementia and remote hippocampal damage, *Neurochem. Res.*, **44**, 1306-1322, doi: 10.1007/s11064-018-2662-0.
28. Li, Y., Tan, L., Yang, C., He, L., Deng, B., Huang, X., Liu, S., Liu, L., Wang, J., and Guo, J. (2022) Comparison of middle cerebral artery occlusion models conducted by Koizumi and Longa methods: a systematic review and meta-analysis of rodent data [Preprint], *Research Square*, doi: 10.21203/rs.3.rs-2398116/v1.
29. Gulyaeva, N., Thompson, C., Shinohara, N., Lazareva, N., Onufriev, M., Stepanichev, M., Moiseeva, Y., Fliss, H., and Hakim, A. M. (2003) Tongue protrusion: a simple test for neurological recovery in rats following focal cerebral ischemia, *J. Neurosci. Methods*, **125**, 183-193, doi: 10.1016/s0165-0270(03)00056-6.
30. Zhanina, M. Y., Druzhkova, T. A., Yakovlev, A. A., Vladimirova, E. E., Freiman, S. V., Eremina, N. N.,

- Guekht, A. B., and Gulyaeva, N. V. (2022) Development of post-stroke cognitive and depressive disturbances: associations with neurohumoral indices, *Curr. Issues Mol. Biol.*, **44**, 6290-6305, doi: 10.3390/cimb44120429.
31. States, B. A., Honkaniemi, J., Weinstein, P. R., and Sharp, F. R. (1996) DNA fragmentation and HSP70 protein induction in hippocampus and cortex occurs in separate neurons following permanent middle cerebral artery occlusions, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **16**, 1165-1175, doi: 10.1097/00004647-199611000-00011.
32. Uchida, H., Fujita, Y., Matsueda, M., Umeda, M., Matsuda, S., Kato, H., Kasahara, J., Araki, T. (2010) Damage to neurons and oligodendrocytes in the hippocampal CA1 sector after transient focal ischemia in rats, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **30**, 1125-1134, doi: 10.1007/s10571-010-9545-5.
33. Ransohoff, R. M. (2016) How neuroinflammation contributes to neurodegeneration, *Science*, **353**, 777-783, doi: 10.1126/science.aag2590.
34. Xu, A. L., Zheng, G. Y., Ye, H. Y., Chen, X. D., and Jiang, Q. (2020) Characterization of astrocytes and microglial cells in the hippocampal CA1 region after transient focal cerebral ischemia in rats treated with Ilexonin A, *Neural Regen. Res.*, **15**, 78-85, doi: 10.4103/1673-5374.264465.
35. Rosenberg, G. A. (2009) Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases, *Lancet Neurol.*, **8**, 205-216, doi: 10.1016/S1474-4422(09)70016-X.
36. Hannocks, M. J., Zhang, X., Gerwien, H., Chashchina, A., Burmeister, M., Korpos, E., Song, J., and Sorokin, L. (2019) The gelatinases, MMP-2 and MMP-9, as fine tuners of neuroinflammatory processes, *Matrix Biol.*, **75-76**, 102-113, doi: 10.1016/j.matbio.2017.11.007.
37. Liu, Y., Wong, T. P., Aarts, M., Rooyackers, A., Liu, L., Lai, T. W., Wu, D. C., Lu, J., Tymianski, M., Craig, A. M., and Wang, Y. T. (2007) NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both *in vitro* and *in vivo*, *J. Neurosci.*, **27**, 2846-2857, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0116-07.2007.
38. Szydlowska, K., and Tymianski, M. (2010) Calcium, ischemia and excitotoxicity, *Cell Calcium*, **47**, 122-129, doi: 10.1016/j.ceca.2010.01.003.
39. Kalia, L. V., Kalia, S. K., and Salter, M. W. (2008) NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead, *Lancet Neurol.*, **7**, 742-755, doi: 10.1016/S1474-4422(08)70165-0.
40. Yang, Y., Li, Q., Miyashita, H., Yang, T., and Shuaib, A. (2001) Different dynamic patterns of extracellular glutamate release in rat hippocampus after permanent or 30-min transient cerebral ischemia and histological correlation, *Neuropathology*, **21**, 181-187, doi: 10.1046/j.1440-1789.2001.00397.x.
41. Krzyżanowska, W., Pomierny, B., Bystrowska, B., Pomierny-Chamioło, L., Filip, M., Budziszewska, B., and Pera, J. (2017) Ceftriaxone- and N-acetylcysteine-induced brain tolerance to ischemia: influence on glutamate levels in focal cerebral ischemia, *PLoS One*, **12**, e0186243, doi: 10.1371/journal.pone.0186243.
42. Magi, S., Piccirillo, S., Amoroso, S., and Lariccia, V. (2019) Excitatory amino acid transporters (EAATs): glutamate transport and beyond, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 5674, doi: 10.3390/ijms20225674.
43. Jiang, T., Jiao, J., Shang, J., Bi, L., Wang, H., Zhang, C., Wu, H., Cui, Y., Wang, P., and Liu, X. (2022) The differences of metabolites in different parts of the brain induced by Shuxuetong Injection against cerebral ischemia-reperfusion and its corresponding mechanism, *Evid. Based Complement. Alternat. Med.*, **2022**, 9465095, doi: 10.1155/2022/9465095.
44. Pocock, J. M., and Kettenmann, H. (2007) Neurotransmitter receptors on microglia, *Trends Neurosci.*, **30**, 527-535, doi: 10.1016/j.tins.2007.07.007.
45. Lori, A., Schultebrasucks, K., Galatzer-Levy, I., Daskalakis, N. P., Katrinli, S., Smith, A. K., Myers, A. J., Richholt, R., Huentelman, M., Guffanti, G., Wuchty, S., Gould, F., Harvey, P. D., Nemeroff, C. B., Jovanovic, T., Gerasimov, E. S., Maples-Keller, J. L., Stevens, J. S., Michopoulos, V., Rothbaum, B. O., Wingo, A. P., and Ressler, K. J. (2021) Transcriptome-wide association study of post-trauma symptom trajectories identified GRIN3B as a potential biomarker for PTSD development, *Neuropsychopharmacology*, **46**, 1811-1820, doi: 10.1038/s41386-021-01073-8.
46. Andersson, O., Stenqvist, A., Attersand, A., and von Euler, G. (2001) Nucleotide sequence, genomic organization, and chromosomal localization of genes encoding the human NMDA receptor subunits NR3A and NR3B, *Genomics*, **78**, 178-184, doi: 10.1006/geno.2001.6666.
47. Chatterton, J. E., Awobuluyi, M., Premkumar, L. S., Takahashi, H., Talantova, M., Shin, Y., Cui, J., Tu, S., Sevarino, K. A., Nakanishi, N., Tong, G., Lipton, S. A., and Zhang, D. (2002) Excitatory glycine receptors containing the NR3 family of NMDA receptor subunits, *Nature*, **415**, 793-798, doi: 10.1038/nature715.
48. Mastroiacovo, F., Moyanova, S., Cannella, M., Gagliione, A., Verhaeghe, R., Bozza, G., Madonna, M., Motolese, M., Traficante, A., Rizzo, B., Bruno, V., Battaglia, G., Lodge, D., and Nicoletti, F. (2017) Genetic deletion of mGlu2 metabotropic glutamate receptors improves the short-term outcome of cerebral transient focal ischemia, *Mol. Brain*, **10**, 39, doi: 10.1186/s13041-017-0319-6.
49. Gulyaeva, N. V. (2021) Glucocorticoid regulation of the glutamatergic synapse: mechanisms of stress-dependent neuroplasticity, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **57**, 564-576, doi: 10.1134/S0022093021030091.
50. Gulyaeva, N. V. (2022) Neuroendocrine control of hyperglutamatergic states in brain pathologies: the effects of glucocorticoids, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **58**, 1425-1438, doi: 10.1134/S0022093022050131.

51. Neumann, S., Boothman-Burrell, L., Gowing, E. K., Jacobsen, T. A., Ahring, P. K., Young, S. L., Sandager-Nielsen, K., and Clarkson, A. N. (2019) The delta-subunit selective GABA_A receptor modulator, DS2, improves stroke recovery via an anti-inflammatory mechanism, *Front. Neurosci.*, **13**, 1133, doi: 10.3389/fnins.2019.01133.
52. Hoque, A., Hossain, M. I., Ameen, S. S., Ang, C. S., Williamson, N., Ng, D. C. H., Chueh, A. C., Roulston, C., and Cheng, H.-C. (2016) A beacon of hope in stroke therapy-Blockade of pathologically activated cellular events in excitotoxic neuronal death as potential neuroprotective strategies, *Pharmacol. Ther.*, **160**, 159-179, doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.02.009.
53. Balakrishnan, K., Hleihil, M., Bhat, M. A., Ganley, R. P., Vaas, M., Klohs, J., Zeilhofer, H. U., and Benke, D. (2022) Targeting the interaction of GABA_B receptors with CaMKII with an interfering peptide restores receptor expression after cerebral ischemia and inhibits progressive neuronal death in mouse brain cells and slices, *Brain Pathol.*, **33**, e13099, doi: 10.1111/bpa.13099.

COMPARATIVE INVESTIGATION OF GLUTAMATE AND GABA GENE EXPRESSION IN THE HIPPOCAMPUS AFTER FOCAL BRAIN ISCHEMIA AND CENTRAL LPS ADMINISTRATION

**T. S. Kalinina¹, G. T. Shishkina^{1*}, D. A. Lanshakov¹, E. V. Sukhareva¹, M. V. Onufriev²,
Y. V. Moiseeva², N. V. Gulyaeva², and N. N. Dygalo¹**

¹ *Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: gtshi@bionet.nsc.ru*

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

Among the responses in the early stages of stroke, activation of neurodegenerative and proinflammatory processes in the hippocampus is of key importance for the development of negative post-ischemic functional consequences. However, it remains unclear which genes are involved in these processes. The aim of this work was a comparative study of the expression of genes encoding glutamate and GABA transporters and receptors, as well as inflammation markers in the hippocampus one day after two types of ischemic exposure (according to Koizumi – MCAO-MK, and Longa – MCAO-ML), as well as after direct pro-inflammatory activation by central administration of lipopolysaccharide (LPS). The results obtained revealed both differences and similarities between the responses to the impacts applied in the work. A greater number of genes that changed the expression associated with the activation of apoptosis and neuroinflammation, glutamate reception, and markers of the GABAergic system were found after MCAO-ML and LPS, than after MCAO-MK. In turn, MCAO-MK and LPS were characterized, in comparison with MCAO-ML, by changes in a larger number of genes involved in glutamate transport. The most pronounced difference between MCAO-ML and MCAO-MK and LPS was changes in the expression of genes for calmodulin and calmodulin-dependent kinases. The revealed features of the responses of the hippocampal transcriptome to two types of ischemia and a pro-inflammatory stimulus will contribute to further understanding of the causes of the diversity of stroke consequences, both in model studies and in the clinic.

Keywords: hippocampus, middle cerebral artery occlusion, lipopolysaccharide, glutamate, GABA, genes expression

УДК 616.8

МИЕЛИНОЛИГОДЕНДРОЦИТАРНЫЙ ГЛИКОПРОТЕИН – АУТОАНТИГЕН ПРИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ДЕМИЕЛИНИЗИРУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЦНС

Обзор

© 2023 Д.Д. Елисеева*, М.Н. Захарова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии»,
125367 Москва, Россия; электронная почта: ddeliseeva@gmail.com

Поступила в редакцию 04.12.2022

После доработки 20.03.2023

Принята к публикации 20.03.2023

Демиелинизирующие заболевания ЦНС развиваются вследствие аутоиммунной атаки на миелиновые оболочки аксонов, структурные белки которых приобретают свойства антигена, в результате чего формируются участки повреждения миелина. Выявление специфических антител, направленных против компонентов миелина, с помощью высокоспециализированных методов лабораторной диагностики позволяет существенно улучшить диагностические подходы. На сегодняшний день заболевания ЦНС, ассоциированные с антителами к миелинолигодендроцитарному гликопротеину (Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein Antibody-associated Disease, MOGAD), являются демиелинизирующими синдромами с четко идентифицированным антигеном. Продемонстрирована патогенная роль антител к MOG (MOG-IgG) человека, что позволяет выделять соответствующее заболевание в отдельную нозологическую форму. Тем не менее ген миелинолигодендроцитарного гликопротеина (*MOG*) способен к альтернативному сплайсингу с формированием различных изоформ, что затрудняет диагностику даже при использовании современных методов иммунофлуоресцентного анализа. С другой стороны, способность MOG к конформационной перестройке обеспечивает структурную целостность других белков миелина и поддерживает процессы аутоolerантности, присущие только человеку.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: демиелинизирующие заболевания, миелинолигодендроцитарный гликопротеин, антитела, альтернативный сплайсинг.

DOI: 10.31857/S0320972523040103, **EDN:** ALMOWX

ВВЕДЕНИЕ

Проблема демиелинизирующих заболеваний ЦНС всегда находилась в центре внимания, что обусловлено достаточно высокой заболеваемостью ими и их клиническим разнообразием. В основе демиелинизирующих заболеваний лежит нейровоспаление, обусловленное аутоиммунной атакой периферических иммунных клеток на антигены ЦНС. Основным гистопато-

логическим событием при демиелинизирующих заболеваниях ЦНС является образование участков (очагов) повреждения белого и серого вещества головного и/или спинного мозга, характеризующееся повреждением миелина, воспалительной периваскулярной инфильтрацией Т- и В-лимфоцитами и макрофагами, активацией микроглии в острый период заболевания и последующим стиханием воспалительного процесса с началом периода восстановления миелина.

Принятые сокращения: ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ЗСОНМ – заболевания спектра оптиконейромиелита; ОРЭМ – острый рассеянный энцефаломиелит; РС – рассеянный склероз; ЦСЖ – цереброспинальная жидкость; MOG – миелинолигодендроцитарный гликопротеин; AQP4 – аквапорин-4; AQP4-IgG – антитела к аквапорину-4; СВА – иммунофлуоресценция, основанная на использовании живых клеток; ELISA – иммуноферментный анализ; Fc – кристаллизующийся фрагмент антитела; FcγR – рецепторы клеток естественных киллеров; IL – интерлейкин; mAb – моноклональное антитело; MBP – основной белок миелина; MOGAD – заболевания ЦНС, ассоциированные с антителами к MOG; MOG-IgG – антитела к MOG; NfL – нейрофиламенты; NK-клетки – клетки-естественные киллеры; OPC – клетки-предшественники олигодендроцитов; PLP – протеолипидный белок.

* Адресат для корреспонденции.

В зависимости от степени повреждения миелиновой оболочки, функциональной и количественной состоятельности миелинообразующих клеток, ремиелинизация может быть полной, частичной или несостоятельной [1]. Механизмы воспалительной демиелинизации могут быть различными. Первичная демиелинизация может развиваться вследствие непосредственной атаки антител на олигодендроциты и компоненты миелина. Вторичная демиелинизация может быть обусловлена поражением других клеток ЦНС, что в результате развивающегося воспаления приводит к вторичной деструкции миелина. Внедрение в практику высокоспецифичных клеточных анализов позволяет выявить первопричину некоторых аутоиммунных заболеваний ЦНС. За последнее десятилетие понимание роли аутоантител в неврологических заболеваниях заметно изменило клиническую тактику. Аутоантитела позволили переклассифицировать некоторые заболевания. Например, открытие антител, нацеленных на аквапорин-4 (AQP4) — белок водных каналов астроцитов у пациентов с клинической картиной оптиконейромиелита — или антител против N-метил-D-аспаратных рецепторов (NMDAR), ассоциирующихся с наиболее распространённым аутоиммунным энцефалитом, позволило выделить соответствующие заболевания в отдельные нозологические формы. Наиболее ценно то, что открытие антител, нацеленных на нейроны, компоненты миелина или глиальные клетки, раскрыло важные диагностические и терапевтические возможности [2, 3].

**MOGAD: ЗАБОЛЕВАНИЯ ЦНС,
АССОЦИИРОВАННЫЕ С АНТИТЕЛАМИ
К МИЕЛИНОЛИГОДЕНДРОЦИТАРНОМУ
ГЛИКОПРОТЕИНУ (MOG) —
НОВАЯ НОЗОЛОГИЧЕСКАЯ ЕДИНИЦА
С ДЕТЕРМИНИРОВАННЫМ АНТИГЕНОМ**

На сегодняшний день самым распространённым и хорошо изученным хроническим заболеванием ЦНС демиелинизирующей природы является рассеянный склероз (РС), который характеризуется появлением множественных очагов поражения преимущественно в белом веществе головного и спинного мозга вследствие развития аутоиммунного воспаления. Заболевание в большинстве случаев протекает с периодами обострений, характеризующихся появлением новых или усугублением имеющихся неврологических расстройств. С течением времени РС приобретает неуклон-

ное прогрессирование неврологического дефицита и приводит к серьёзной инвалидизации лиц в основном молодого и среднего возраста. Однако до сих пор не установлены точные механизмы, инициирующие выработку специфических антител и активацию эффекторных лимфоцитов при РС [4]. Большинство исследователей предполагает, что РС имеет первичную аутоиммунную этиологию. Огромное количество исследований, проведённых за последние несколько десятилетий, было сосредоточено на раскрытии иммунологических причин РС и поиске молекулярных мишеней. Благодаря этому обнаружены прочные генетические ассоциации с механизмами иммунной регуляции и выяснены механизмы иммунной атаки на элементы ЦНС. Однако наблюдение за естественным течением РС выявило некоторые несоответствия, которые ставят под сомнение предположение об исключительно аутоиммунной теории развития РС. Другая точка зрения предполагает, что РС является нейродегенеративным заболеванием, и первоначальный сбой происходит в клетках и структурах ЦНС. Эта альтернативная модель утверждает, что первичная цитодегенерация является начальным событием, в ходе которого высвобождаются высокоантигенные компоненты, вторично способствующие запуску каскада иммунопатологических процессов [5]. В настоящее время постановка диагноза РС основывается на определённых клинических проявлениях, данных нейровизуализации и выявлении интратекального синтеза олигоклональных иммуноглобулинов, подчёркивающих роль В-лимфоцитов в патогенезе заболевания [6]. Ранее демиелинизирующие синдромы ЦНС, которые не соответствовали критериям РС, считались его атипичными вариантами. Совершенствование возможностей лабораторной диагностики, в частности, иммунофлуоресцентных методов, основанных на живых клетках (cell-based assay, или СВА), позволяет с высокой точностью выявлять антитела к антигенным компонентам миелина.

Поиск специфических антител, обладающих патогенностью при атипичных вариантах РС, достиг большого успеха в 2004 г. Тогда были идентифицированы специфические аутоантитела у пациентов с клинической картиной оптиконейромиелита, проявляющегося одно- или двусторонним оптическим невритом и продольным распространённым поперечным миелитом, захватывающим более чем три позвоночных сегмента [7]. Выявленные антитела направлены против AQP4, который является белком водного канала и экспрессируется

в периваскулярной зоне на астроцитарных ножках вокруг кровеносных сосудов. Открытие антител к AQP4 (AQP4-IgG) в качестве целевого антигена однозначно подтвердило существование оптиконеуромиелита как отдельной нозологической единицы, отличной от РС [8]. С течением времени методом СВА AQP4-IgG были выделены не только у пациентов с оптико-спинальным фенотипом, но и с другими локализациями демиелинизирующего поражения головного мозга, дисэнцефальной области, *area postrema* или ствола мозга. Позже был введён термин ЗСОНМ (заболевания спектра оптиконеуромиелита), который объединил как серопозитивные, так и серонегативные по AQP4-IgG формы заболевания с типичной клинико-радиологической картиной [9]. Следует отметить, что демиелинизация, обусловленная AQP4-IgG, является вторичной, так как основные события патогенеза связаны с развитием астроцитопатии и повреждением гематоэнцефалического барьера (ГЭБ). Повышение проницаемости ГЭБ инициирует проникновение эффекторных лимфоцитов, антител и гранулоцитов в ЦНС. AQP4-IgG синтезируются плазмобластами на периферии, что может быть обусловлено широким распространением белка AQP4 вне ЦНС (собираательные каналцы почек, париетальные клетки желудка, эпителиальные клетки слизистых оболочек бронхов, скелетные мышцы). Провоспалительный цитокиновый профиль, антитело- и комплемент-зависимая клеточная цитотоксичность и нарушение гомеостаза воды и электролитов приводят к вторичному поражению миелина [10]. Таким образом, при ЗСОНМ не секретируются антитела непосредственно против компонентов миелиновой оболочки. Поражение миелина происходит в местах высокой экспрессии белка AQP4 (зрительные нервы, спинномозговой канал, циркумвентрикулярные органы, т.е. зоны ЦНС, тесно прилегающие к эпидуральной выстилке). Однако диагностическая неопределённость в случае отрицательных серологических результатов заставляла исследователей продолжать поиск других иммунологических маркеров демиелинизирующих синдромов ЦНС.

Позже были идентифицированы сывороточные антитела к MOG (MOG-IgG). Данные антитела достоверно выявляются у большого процента детей с острым рассеянным энцефаломиелитом (ОРЭМ). Во взрослой популяции повышенные титры MOG-IgG определяются с наибольшей частотой при рецидивирующих оптических невритах, миелитах различной

протяжённости, энцефаломиелитах, стволовых энцефалитах, реже встречаются ОРЭМ-подобные фенотипы и корковые энцефалиты. Высокие титры MOG-IgG выявляются более чем у 40% пациентов с ЗСОНМ с серонегативным статусом по AQP4-IgG [11]. В связи с этим первоначально MOGAD рассматривались как один из фенотипов ЗСОНМ. В первую очередь это было обусловлено совпадением клинических проявлений, особенно во взрослой когорте больных. Однако на основании данных гистологических исследований были продемонстрированы различные иммунопатологические паттерны. Для MOGAD характерна перивенозная воспалительная демиелинизация с инфильтрацией макрофагами, В-лимфоцитами, CD4⁺ Т-клетками и менее выраженным отложением активированного комплемента и иммуноглобулина по сравнению с ЗСОНМ [12]. В большинстве случаев MOGAD гистопатологическая картина соответствует II паттерну демиелинизации, который характерен для РС или ОРЭМ («рукава демиелинизации»). Кроме того, при MOGAD не наблюдается деструкции астроцитов и потери экспрессии AQP4. В срезах биопсийного материала выявляются реактивные гипертрофированные астроциты, апоптотические олигодендроциты с уплотнённым ядром и сохранные преолигодендроциты, не экспрессирующие MOG. В очагах демиелинизации при MOGAD отмечается более выраженная потеря окрашивания MOG, чем других белков миелина, выявляются макрофаги, нагруженные MOG, что свидетельствует о MOG-доминантной демиелинизации. При этом в большинстве случаев аксоны остаются сохранными, достаточно редко выявляются аксоны с признаками отёка. При редких тяжёлых формах MOGAD могут определяться аксональные сфероиды [13, 14].

Впервые в 2018 г. были опубликованы международные диагностические критерии для MOGAD, которые затем были уточнены в 2023 г. В настоящее время MOGAD выделены в отдельную нозологическую форму, отличную от известных нейровоспалительных заболеваний, в том числе РС и ЗСОНМ [15, 16]. По сути, MOGAD – первые известные демиелинизирующие заболевания ЦНС аутоиммунной природы, при которых развивается первичная демиелинизация и чётко идентифицированы антиген/антитело. Выделение MOGAD из спектра других аутоиммунных демиелинизирующих синдромов с известными или неизвестными антигенами очень важно в плане дифференциальной диагностики, прогноза и тактики лечения. Однако длительное

время обсуждался вопрос о том, являются ли MOG-IgG, выявляемые в сыворотке пациентов, патогенными сами по себе или представляют собой иммунологический эпифеномен предшествующей демиелинизации и являются клинически значимым биомаркером заболевания.

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ MOG

Миелин, синтезируемый олигодендроцитами, представляет собой сложную многослойную структуру и включает различные цитоплазматические и трансмембранные белки, которые взаимодействуют с высокоорганизованными липидами и гликолипидами. Подобные связи обеспечивают целостность, поддержание структуры и функционирование миелиновой оболочки аксонов. Большинство белков миелина составляют белковые семейства, включающие несколько изоформ и возникающие в результате альтернативного сплайсинга уникального гена [17]. Основная часть протеинов миелина ЦНС принадлежит к двум основным семействам: основному белку миелина (MBP) и протеолипидному белку (PLP). Существуют также второстепенные компоненты, которые включают гликопротеины, такие как миелин-ассоциированный гликопротеин (MAG) и MOG, которые совместно с другими компонентами миелина играют важную роль в создании миелиновой оболочки [18].

MOG был впервые идентифицирован в конце 70-х гг. прошлого века, когда было показано, что компонент миелина ЦНС, названный M2 и отличный от MBP и PLP, индуцирует иммунный ответ в виде демиелинизации у морских свинок [19]. В следующих экспериментах антиген M2 был локализован в ткани мозжечка крыс с помощью мышинового моноклонального антитела (mAb) 8-18C5. На основании тканевой и клеточной локализации, молекулярной массы и перекрёстной иммунной реактивности продемонстрировано, что это специфическое mAb выявило новый антиген миелина, который идентичен MOG. Методом ультраструктурной иммуноцитохимии при использовании mAb 8-18C5 показано, что MOG экспрессируется на телах олигодендроцитов, их отростках и неуплотнённых абаксональных (прилежит к базальной мембране) и адаксональных (отделена от аксональной мембраны периаксональным пространством) миелиновых мембранах [20]. Белок MOG имеет молекулярную массу 26–28 кДа и состоит из 218 аминокислот (плюс 29 аминокислотных остатков – «сигнальный пептид»). Эпи-

топ MOG, взаимодействующий с mAb 8-18C5, был обнаружен только у млекопитающих, в отличие от эволюционно более древних MBP и PLP [21, 22].

MOG представляет собой интегральный мембранный белок типа I и принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов (Ig), обладающих одним внеклеточным варибельным доменом (IgV), одним трансмембранным гидрофобным доменом, короткой цитоплазматической петлёй и второй гидрофобной областью внутри двойного слоя мембраны (трансмембранная область), за которой следует цитоплазматический конец. Такая структура уникальна, поскольку другие члены этого суперсемейства либо имеют один трансмембранный домен, либо прикреплены к поверхности мембраны гликозилфосфатидил-инозитольным якорем [23]. Используя рекомбинантный MOG, исследователи определили, что эпитоп 8-18C5 содержится в IgV-подобном домене, но на тот момент времени попытки уточнить сайт связывания mAb 8-18C5 не увенчались успехом. В связи с этим было сделано предположение, что MOG подвергается димеризации, и димерная форма частично маскирует эпитоп 8-18C5, который является конформационным [24].

Демиелинизация при MOGAD развивается вследствие образования тримолекулярного комплекса, состоящего из T-клеточного рецептора (TCR), MOG и человеческого лейкоцитарного антигена (HLA) [25]. T-Клетки идентифицируют три эпитопа MOG (остатки: 1–22, 35–55, 92–106), присутствующих во внеклеточном домене, как аутоантигены и иницируют процесс генерации антител. Показано, что MOG 1-22, MOG 35-55 и MOG 92-106 являются энцефалитогенными эпитопами. Также петля FG (остатки 92–106) была определена как эпитоп для взаимодействия с mAb 8-18C5, причём остатки гистидина-103 и серина-104 этого участка MOG необходимы для связывания с антителами [26]. MOG 35-55 использовался в качестве иммунодоминантного эпитопа в большом числе экспериментальных моделей животных. При этом MOG 35-55 человека проявил слабоэнцефалитогенные свойства по сравнению с аналогичным участком MOG крыс. Иммунодоминантный пептид MOG 35-55 является частью высококонсервативной области белка MOG (остатки 20–50) с полиморфизмом одной аминокислоты в положении 42, что является единственным отличием между белком MOG человека и животных (мышь, крыса). MOG человека и высших приматов в положении 42 имеет пролин, грызунов – серин. Данное обстоятельство объясняет, почему эпи-

топы MOG человека не могли быть идентифицированы антителами грызунов [27]. Патогенная активность MOG-IgG была проанализирована *in vivo* при переносе аффинно очищенных антител пациентов с MOGAD экспериментальным животным. При этом были выбраны антитела, которые распознавали разные эпитопы MOG (CC'- и FG-петля) с перекрёстной реактивностью к MOG грызунов. В этом случае исключались другие конформации антител. После интратекальной инъекции MOG-IgG пациентам экспериментальным крысам Lewis у животных развилось демиелинизирующее заболевание. Антитела совместно с родственными MOG-специфичными Т-клетками усиливали инфильтрацию Т-клеток и индуцировали демиелинизацию, связанную с отложением C9neo (антиген, являющийся маркером литического комплекса комплемента, депонирующегося исключительно в зонах активного разрушения миелина), напоминающую паттерн демиелинизации II типа, характерный для РС [28]. Белок MOG человека является гетерогенным, и MOG-IgG, полученные от пациентов с MOGAD, распознают эпитопы, отличные от эпитопов MOG животных. В исследованиях с использованием одноточечных мутаций было обнаружено семь различных паттернов связывания для MOG-IgG у пациентов с MOGAD. Наиболее часто мутации были обнаружены на участке CC'-петли (остатки 41–46) и FG [29].

Гликозилирование вносит огромное структурное разнообразие и регулирует биологическую активность белков. Посттрансляционные модификации белков из-за присутствия сайтов *N*-гликозилирования влияют на сворачивание, локализацию и функцию белка. Связывание антител с антигеном зависит от сайта гликозилирования [30]. MOG имеет один *N*-связанный сайт гликозилирования (N31). Гликозилирование снижает гибкость MOG как в несвязанных, так и в связанных с Fab-фрагментом антител состояниях. В исследованиях показано, что гликан усиливает стабильность белка MOG и помогает ему сохранять почти нативную складчатую конформацию [31]. Обнаружено, что гликан, присоединённый к MOG, является стерическим препятствием для распознавания антигена у некоторых пациентов [32].

В настоящее время функции MOG остаются малоизученными. То, что MOG локализуется на внешней поверхности миелина и имеет внеклеточный домен, делает его доступным для потенциальных антител. Локализация других компонентов миелина затрудняет взаимодействие с антителами и Т-клетками. PLP также является трансмембранным белком, но

имеет чрезвычайно гидрофобную природу и скрыт внутри плотного многослойного миелина. MBP прикрепляется к внутренней поверхности клеточной мембраны и располагается преимущественно в цитоплазме. MAG находится в самом внутреннем слое миелиновых листов, который остаётся в тесном контакте с аксональной мембраной [33].

Экспрессия MOG начинается с началом миелинизации и, таким образом, является возможным маркером дифференцировки для созревания олигодендроцитов [34]. Во время процесса миелинизации происходит увеличение экспрессии MBP, который ответственен за стабилизацию микротрубочек (белковые внутриклеточные структуры, входящие в состав цитоскелета) в олигодендроцитах. Чрезмерная стабилизация микротрубочек, в свою очередь, приводит к ретракции нормальной миелиновой оболочки. В исследованиях продемонстрировано, что добавление антитела 8-18C5 против MOG вызывает локальную деградацию MBP и приводит к деполимеризации микротрубочек. Известно, что для миелинизации необходим непрерывный оборот микротрубочек, и, вероятно, взаимодействие сигналов от этих двух белков поддерживает динамическое равновесие микротрубочек в олигодендроцитах [35].

Предполагается, что MOG может не играть прямой роли в процессе миелинизации, точнее, он способен опосредовать взаимодействие между миелином и иммунной системой. Одной из уникальных функций миелина ЦНС является его способность прямо активировать классический путь комплемента. Таким образом, миелин ЦНС должен содержать белок, способный связывать компонент комплемента C1q и запускать дальнейший каскад. Демонстрировано, что высокоочищенный нативный MOG и рекомбинантный внеклеточный IgV-подобный домен MOG связывают C1q дозозависимым образом [36].

Состав и функция миелина также зависят от механизмов адгезии, опосредованных эпитопами человеческого естественного киллера-1 (HNK-1), являющегося уникальным трисахаридом, содержащим сульфатированную глюкуроновую кислоту, и преимущественно экспрессирующегося на клетках нервной системы. Эти молекулы, первоначально идентифицированные как маркеры адгезии, обеспечивают взаимодействие нейронов с глиальными клетками и рост астроцитарных отростков. Исследования показали, что некоторый объём MOG (вместе с MAG) гликозилирован HNK-1. Следовательно, MOG может обеспечивать контакт между соседними миелинизированными волокнами [37].

ВАРИАНТЫ АЛЬТЕРНАТИВНОГО СПЛАЙСИНГА *MOG*

Ген *MOG* человека локализован в главном комплексе гистосовместимости (МНС) на хромосоме 6p21.3-p22 и является представителем суперсемейства белков иммуноглобулинов. Более детальное картирование гена *MOG* показало, что он расположен на расстоянии 60 т.п.н. от альфа-цепи F МНС-I в теломерной ориентации [38]. Предполагается, что такое тесное расположение у области МНС может обуславливать ряд функций *MOG* в отношении инициации аутоиммунного ответа. В 2006 г. был проведён первый полный анализ альтернативного сплайсинга гена *MOG* у пяти репрезентативных видов от грызунов до человека и обнаружено, что в отличие от других белков миелина, наиболее сложные паттерны сплайсинга *MOG* характерны исключительно для высших млекопитающих (человека и приматов). Структурные и топографические особенности сплайс-вариантов *MOG* могут выступать в роли фактора, имеющего важное значение для фенотипической экспрессии аутоиммунитета [39]. Ген *MOG* человека содержит 10 экзонов, которые демонстрируют сложную схему альтернативного сплайсинга, в результате которого образуется 17 изоформ *MOG*. Наиболее изученными из них на сегодняшний день являются 6 изоформ, и в зависимости от экзонного состава и молекулярной массы выделяют альфа- (α_1 , α_2 и α_3) или бета- (β_1 , β_2 , β_3) изоформы, которые отличаются по составу внутриклеточной (цитоплазматической) С-концевой области. Все варианты сплайсинга мРНК содержат экзон 1 (сигнальный пептид), экзон 2 (Ig-подобный домен), экзон 4 (первый трансмембранный домен) и малые экзоны 5 и 6 (цитоплазматическая область). Экзоны 5, 6, 7, 9 и 10a/b кодируют гидрофильные домены, обнаруженные на цитоплазматической поверхности липидного бислоя. Экзон 8 кодирует ассоциированную с мембраной внутриклеточную часть транскриптов α_1 и β_1 . Экзоны 10a и 10b кодируют С-концевые аминокислоты, которые определяют изоформы α и β .

Включение экзона 3 в два варианта *MOG* вызывает преждевременную терминацию белка из-за присутствия нескольких стоп-кодонов в рамке считывания, что приводит к сборке двух самых коротких изоформ *MOG*, идентичных по аминокислотной последовательности и представляющих собой растворимые Ig-домены, поскольку ни одна из их трансмембранных и цитоплазматических областей не транслируется [40, 41].

Следует отметить, что по сравнению с полноразмерными изоформами *MOG* (α_1 и β_1), другие изоформы белка не транслируются или транслируются слабо, таким образом, они не могут быть обнаружены с помощью метода иммуноферментного анализа (ELISA) и иммуноблоттинга. Кроме того, растворимые изоформы *MOG* возможно выявить, вероятнее всего, только в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ). Действительно, результаты недавнего исследования свидетельствуют о том, что у ряда пациентов с *MOGAD* обнаруживается интратекальный синтез *MOG-IgG*. Интересным является тот факт, что скорректированный индекс *MOG-IgG* в ЦСЖ/сыворотке, но не титр *MOG-IgG* в сыворотке может свидетельствовать о более неблагоприятном течении заболевания [42].

При изучении альтернативных вариантов гена *MOG* в процессе развития головного мозга человека продемонстрировано, что основная изоформа мРНК *MOG* α_1 экспрессируется уже на 21 неделе внутриутробного развития. В биопсийном материале головного мозга 2-летнего ребёнка уровень экспрессии *MOG* α_1 становится более выраженным, а также начинают обнаруживаться и другие изоформы. Представленные данные показывают, что усиление экспрессии и появление дополнительных изоформ *MOG* по мере развития организма положительно коррелирует со стадиями миелинизации и приобретением скоординированной активности ЦНС в этом возрасте (например, развитием речи) [43]. Эти результаты напоминают сдвиг экспрессии двух изоформ гена *PLP* во время развития головного мозга человека, поскольку изоформа *PLP*, *DM20*, преобладает в пренатальном периоде, а сам *PLP* более высоко экспрессируется со второго года жизни, когда его количество составляет 50%. В этом контексте обнаружение вариантов сплайсинга *MOG* во время позднего развития предполагает, что их роль может быть специфичной и свидетельствовать о зрелости миелина. Кроме того, интересным является тот факт, что некоторые изоформы могут повторно экспрессироваться во время процесса ремиелинизации [44].

АНАЛИЗ ОТВЕТА IGG НА РАЗЛИЧНЫЕ ИЗОФОРМЫ *MOG*

В связи с тем, что *MOG* обладает конформационной изменчивостью, обнаруживаются различные паттерны связывания с *MOG-IgG*. Наиболее часто эпитопы располагаются в петлях между β -слоями внеклеточного Ig-домена

MOG человека. В ретроспективном исследовании были проанализированы образцы сыворотки от 202 пациентов с положительным серостатусом по MOG-IgG, определённым СВА с использованием живых клеток с MOG α_1 и однократной трансфекцией клеток НЕК293 другими изоформами MOG. Экспрессия изоформ на клеточной поверхности была продемонстрирована путём проведения СВА на основе живых клеток с серийными разведениями гуманизированного мышинного mAb MOG 8-18C5. Несмотря на небольшие различия в эффективности трансфекции, изоформы MOG продемонстрировали сравнимое специфическое связывание с поверхностью гуманизированного mAb MOG 8-18-C5. Таким образом, все внеклеточные домены различных изоформ MOG были определены как одинаково доступные для связывания антител. Согласно результатам исследования, наибольшая реактивность IgG направлена против самых длинных изоформ MOG α_1 (используемый в настоящее время стандартный СВА для MOG-IgG) и β_1 , тогда как более короткие изоформы α_2 , α_3 , β_2 и β_3 распознаются реже, однако это не исключает их патогенности в отношении развития MOGAD. Выявлены 3 различных паттерна связывания антител при MOGAD: (1) изолированное связывание только с MOG α_1 и β_1 ($\alpha_1\beta_1$), (2) смешанное связывание с доминирующим распознаванием α_1 и β_1 и по крайней мере одной дополнительной α -изоформы MOG, но не с изоформами β ($\alpha_{1-3}\beta_1$), и (3) связывание со всеми изоформами MOG ($\alpha_{1-3}\beta_{1-3}$). При этом $\alpha_1\beta_1$ и $\alpha_{1-3}\beta_1$ MOG-IgG более распространены у детей, а $\alpha_{1-3}\beta_{1-3}$ MOG-IgG – у взрослых. Это наблюдение согласуется с предыдущими данными, показывающими доминантную экспрессию изоформ MOG α_1 и β_1 на раннем этапе развития человека [45]. Каких-либо отличий и корреляций выявленных паттернов связывания антител с клиническими проявлениями MOGAD выявлено не было. Обнаружение дифференциальных моделей связывания изоформ MOG может объяснить ряд противоречивых результатов, полученных при проведении СВА с фиксированными клетками: данный тест может не определять IgG к некоторым альтернативным изоформам MOG [46].

Последовательность *MOG* высоко консервативна между видами как на уровне нуклеотидов, так и на уровне аминокислот, что характерно и для других генов миелина. Однако в ряде исследований было показано, что альтернативные паттерны сплайсинга гена *MOG* более сложны у людей по сравнению с мышами.

Экзон 2, который кодирует Ig-подобный домен для MOG, по-видимому, претерпел процессы адаптивного «перетасовывания» в процессе эволюции, поскольку он является общим с рядом других генов. В частности, Ig-подобный участок *MOG* (экзон 2) гомологичен Ig-подобному домену гена бутирофилина (46% идентичности), основного гликопротеина, обнаруживаемого в глобулах молочного жира. Экспрессия бутирофилина связана исключительно с лактацией и не представлена в структуре миелина. Таким образом, вполне вероятно, что эта гомология возникла в результате перетасовки экзонов – процесса, посредством которого общий Ig-подобный домен становится ассоциированным с другими неродственными функциональными экзонами [47]. Эти эволюционные события обеспечивают возможность дифференциальной экспрессии изоформ MOG в качестве дополнительного источника фенотипического разнообразия среди видов. Экспрессия изоформ MOG, сходная с заменами в нуклеотидных последовательностях генов, которые могут привести к образованию функционально разных белков, может лежать в основе разной биологической роли этого белка у разных видов и у одного вида в норме и при патологии.

ЭНДОФЕНОТИПЫ MOGAD

Клинический фенотип MOGAD имеет определённые отличия в разных возрастных группах. Так, дети до 12 лет в основном страдают ОРЭМ с крупными асимметричными очагами поражения вещества мозга, который в 10–20% случаев может сопровождаться одновременным или следующим за острой атакой невритом зрительных нервов. В когорте взрослых пациентов (от 12 лет) ОРЭМ-подобный фенотип встречается значительно реже, и в клинической картине как дебюта MOGAD, так и последующих рецидивов преобладают односторонние или двусторонние оптические невриты с поражением или без поражения спинного мозга и ствола головного мозга, или же они сочетаются с атипичной демиелинизацией другой локализации [48]. До настоящего времени механизмы, посредством которых MOG-IgG человека осуществляют патогенное влияние, и то, как оно соотносится с возрастными особенностями заболевания, остаются до конца не выясненными [49]. Известно, что эффекторные функции антител в значительной степени опосредованы кристаллизующимся фрагментом (Fc) IgG за счёт связывания

клеточных рецепторов Fc γ (Fc γ R) на поверхности клеток-естественных киллеров (NK-клетки) и макрофагов. Кроме того, Fc-фрагмент IgG играет важную роль в связывании компонента комплемента C1q и запуске каскада ферментативных реакций, приводящих к формированию мембраноатакующего комплекса, образование которого на мембране клетки приводит к её лизису. Таким образом реализуется комплемент-зависимая клеточная цитотоксичность [50].

В зависимости от эффекторных функций MOG-IgG можно выделить два эндофенотипа MOGAD. Эндофенотип 1 (провоспалительный) характеризуется резко положительными титрами MOG-IgG с высокой способностью связывать Fc γ R и опосредовать антителозависимую активацию NK-клеток как у детей, так и у взрослых, тогда как при эндофенотипе 2 определяются невысокие титры MOG-IgG и более низкая Fc γ R-связывающая способность. Кроме того, эндофенотипы различаются по механизму гликозилирования Fc-фрагмента MOG-IgG. Гликан, присоединённый к Fc-фрагменту IgG, в частности, к его тяжёлой цепи, имеет решающее значение для поддержания как провоспалительных, так и противовоспалительных функций IgG [51]. При эндофенотипе 1 MOGAD преобладает агалактозилирование Fc-фрагмента, при эндофенотипе 2, в свою очередь, более распространено сиалирование Fc-фрагмента MOG-IgG. Примечательно, что корреляция между титрами, связыванием Fc γ R и профилями гликозилирования Fc-фрагмента выше во время острой стадии, чем во время ремиссии MOGAD, и не зависит от возраста. Таким образом, активная фаза MOGAD характеризуется активным гуморальным ответом с более высокой аффинностью связывания Fc γ R (за счёт антитело-опосредованной активации NK) и агалактозилированием и асиалированием Fc-фрагмента MOG-IgG, что усиливает провоспалительную активность антител [52].

В детской популяции с MOGAD была выявлена более низкая способность MOG-IgG опосредовать клеточную цитотоксичность NK-клетками по сравнению с когортой взрослых. Это связано с тем, что у детей с MOGAD преобладает фукозилирование Fc-фрагмента IgG, а Fc-фукоза предотвращает взаимодействие между IgG и Fc γ R, тем самым уменьшая способность к активации NK-клеток [53]. Действительно, полученные результаты согласуются с данными о снижении фукозилирования Fc-фрагмента IgG в течение жизни [54].

С другой стороны, присутствие *N*-ацетилглюкозамина в участке *N*-гликозилирова-

ния (N31) MOG способствует антителозависимой клеточной цитотоксичности в случае, когда антитело находится в комплексе с антигеном [55]. При этом гликозилирование Fab-фрагмента MOG-IgG имеет положительную корреляцию с возрастом. Таким образом, гликоформы MOG-IgG могут существенно влиять на потенциал функциональной провоспалительной активности MOG-IgG. Изменение гликозилирования антител может обуславливать снижение титра антител в период ремиссии заболевания, а персистирующая серопозитивность может являться предиктором рецидивирующего течения MOGAD [56]. Отличие в гликозилировании MOG-IgG у детей и взрослых может в том числе обуславливать клиническое разнообразие MOGAD. Это предположение согласуется с экспериментальными данными на мышинных моделях, где продемонстрировано, что галактозилирование или сиалирование изменяет структуру IgG и увеличивает сродство к активации Fc γ R [57].

Кроме того, при других известных аутоиммунных заболеваниях, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, неспецифический язвенный колит (болезнь Крона), также имеет место увеличение количества агалактозилированных гликоформ как сывороточных, так и антигенспецифических IgG, и уровень этих гликоформ коррелирует с клинической активностью заболевания. Хотя Fc-связанный сахар содержит только незначительную фракцию сиалированных структур, сообщается, что асиалированные глико-варианты антител увеличиваются у пациентов с системными заболеваниями соединительной ткани и предшествуют рецидивам заболевания [58]. Таким образом, более высокие уровни агалактозилированного и асиалированного IgG могут быть связаны с клинической активностью MOGAD, что подтверждается наблюдениями, сделанными при других аутоиммунных заболеваниях.

МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ СЫВОРОТОЧНЫХ MOG-IgG

Первые попытки выявления MOG-IgG в сыворотке взрослых пациентов выполнялись с помощью метода ELISA, и было получено множество разнородных результатов, которые не дали достоверной ассоциации с какой-либо формой демиелинизации. Предпосылкой к попытке поиска MOG-IgG при атипичной демиелинизации у взрослых явилось то обстоятельство, что у педиатрических пациентов

более чем в 50% случаев ОРЭМ выявлялись MOG-IgG, и метод ELISA в этом случае обладал достаточно высокой специфичностью и чувствительностью. Однако у взрослых пациентов данная методика не дала столь многообещающих результатов. С течением времени не прекращались попытки идентифицировать MOG-IgG у взрослых пациентов с атипичными демиелинизирующими синдромами, отличными от РС. Итак, начиная с 2018 г. на основании множества исследований тестирование на MOG-IgG было рекомендовано выполнять только методом СВА на основе живых или фиксированных клеток с последующей иммунофлуоресцентной микроскопией (СВА-IF) или проточной цитометрией (СВА-FACS). С целью международной стандартизации Reindl et al. в 2020 г. опубликовали результаты исследования воспроизводимости различных методик определения MOG-IgG в 5 международных центрах. При проведении сравнительного анализа данных, полученных с использованием СВА на основе живых клеток во всех исследовательских центрах, было найдено совпадение высокого уровня (96%) для образцов, которые ранее были идентифицированы как достоверно положительные или отрицательные по MOG-IgG. Более низкое совпадение данных отмечено при выполнении СВА-IF с фиксированными клетками (тест-система Euroimmun); оно составило 90%, что обусловлено потерей некоторых конформационных эпитопов MOG при фиксации. Важно, что большинство отрицательных результатов при фиксированном анализе было получено от больных с типичным клиническим фенотипом MOGAD, и при повторном проведении анализа методом СВА на основе живых клеток у них были показаны высокие титры MOG-IgG. Соответственно, необходимо учитывать, что использование коммерческого (фиксированного) метода СВА может привести к ошибкам диагностики в 10% случаев. Метод ELISA не был сопоставим с СВА в случае как положительных, так и отрицательных результатов анализа на MOG-IgG в сыворотке. Впоследствии было установлено, что MOG представляет собой гликопротеин со сложной конформационной структурой и может образовывать различные сплайс-варианты, а с учётом того, что ELISA денатурирует нативную третичную форму белка, ошибки детекции выявляются в большом проценте случаев. Данное обстоятельство ещё раз подчёркивает, что ELISA не может использоваться для обнаружения MOG-IgG у человека [59].

БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ MOGAD: ЦИТОКИНЫ И НЕЙРОФИЛАМЕНТЫ

Любое нейровоспаление будет сопровождаться изменением цитокинового профиля. При этом особый интерес, в том числе и при демиелинизирующих синдромах, представляет изменение уровня цитокинов, хемокинов, продуктов распада миелина, глиальных клеток и аксонов в ЦСЖ. При сравнительном исследовании панели цитокинов МВР (как маркер поражения миелина) и GFAP (глиальный кислый белок – маркер поражения астроцитов) при РС, ЗСОНМ и MOGAD продемонстрировали ряд отличий. В ЦСЖ больных с MOGAD и ЗСОНМ в активной стадии были выявлены повышенные концентрации цитокинов, секретируемых Th17 (Т-хелперы 17). В первую очередь изменения коснулись интерлейкинов IL-6 и IL-8, GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор). Кроме того, отмечалась повышенная продукция IFN- γ (интерферон-гамма), TNF- α (фактора некроза опухолей альфа) и IL-10 по сравнению с РС. Также при этих двух нозологических формах отмечалась более высокая концентрация МВР в ЦСЖ. В случаях с ЗСОНМ уровень GFAP по сравнению с MOG и РС был значительно выше и коррелировал с уровнем IL-6 и МВР. Таким образом, цитокины, продуцируемые Th17, могут играть важную роль в патогенезе обоих заболеваний, ассоциированных с выработкой антител против MOG и AQP4. Несмотря на то, что точные механизмы остаются неизвестными, можно предположить, что наивные CD4⁺ Т-клетки, играющие ведущую роль в инициации аутоиммунного процесса, проходят путь дихотомии под воздействием IL-6 и дифференцируются больше в сторону Th17, чем Т-регуляторных клеток, обеспечивающих поддержание иммунологической толерантности. В этом случае происходит гиперпродукция GM-CSF и IL-17A, что обуславливает рекрутинг воспалительных клеток, включая полиморфноядерные клетки (нейтрофилы), в ЦНС. Действительно, при рутинном анализе ЦСЖ при MOGAD и ЗСОНМ достаточно часто определяется умеренный плеоцитоз, что редко наблюдается при РС. Кроме того, IL-6 может стимулировать плазмобласты и В-клетки, способствуя выработке аутоантител. IL-6 повышает проницаемость ГЭБ, облегчая проникновение провоспалительных факторов в ЦНС [60]. Ранее важная роль IL-6 как плейотропного цитокина была доказана в патогенезе синдромов,

ассоциированных с AQP4-IgG [61]. В ходе клинических исследований продемонстрировано, что гуманизированное mAb, ингибирующее сигнальный путь IL-6, значительно снижает риск рецидива у пациентов с ЗСОНМ с положительным тестом на AQP4-IgG [62]. С учётом того, что цитокиновые профили при MOGAD и ЗСОНМ значительно схожи, можно ожидать, что терапевтические мишени могут быть одними и теми же.

В настоящее время доступно количественное определение уровня лёгких цепей нейрофиламентов (NfL), которые являются компонентами нейронального цитоскелета и играют важную роль в росте и поддержании стабильности аксонов. NfL являются биомаркером степени повреждения аксонов при различных неврологических заболеваниях [63]. В частности, уровни NfL в сыворотке повышены у пациентов с РС и коррелируют с клинико-рентгенологической активностью, тяжестью и скоростью прогрессирования инвалидизации [64]. При ЗСОНМ уровень NfL нарастает в периоды обострения заболевания и коррелирует со степенью инвалидизации [65]. При измерении NfL в сыворотке крови больных MOGAD было выявлено, что содержание NfL максимально повышается в дебюте заболевания, с течением времени наблюдается тенденция к снижению концентрации, и в последующем даже при развитии обострений отмечается лишь незначительное повышение уровня NfL. Таким образом, повреждение аксонов при MOGAD в основном обусловлено первой атакой заболевания, что в очередной раз подчёркивает отличие MOGAD от РС и ЗСОНМ и, вероятно, отражает более благоприятный прогноз для пациентов, но в то же время свидетельствует о важности своевременного и надлежащего лечения с самого начала заболевания [66].

МЕХАНИЗМЫ ВОССТАНОВЛЕНИЯ МИЕЛИНА ПРИ ДЕМИЕЛИНИЗИРУЮЩИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЦНС

Регенерация миеллина ЦНС после эпизода демиелинизации в основном опосредована мультипотентной паренхиматозной популяцией стволовых клеток — клеток-предшественников олигодендроцитов (ОРС). В случае появления зоны поражения миеллина ОРС быстро амплифицируются в областях его повреждения, где они впоследствии дают начало новым миелинизирующим олигодендроцитам [67]. ОРС представляют собой высокопролифера-

тивные, подвижные биполярные клетки, экспрессирующие высокие уровни ганглиозидов. Спецификация и дифференцировка ОРС регулируются транскрипционными факторами олигодендроцитов 1 и 2 [68]. ОРС составляют 5–8% всех клеток ЦНС и диффузно распределены во взрослом мозге с наибольшим скоплением в субвентрикулярной зоне, зрительном нерве, моторной коре, мозолистом теле и мозжечке. Указанные зоны являются резервуаром новых олигодендроцитов [69]. Олигодендроциты постоянно пролиферируют в здоровом мозге для поддержания своей клеточной плотности, но значительно медленнее, чем это происходит в детском возрасте или при повреждении [70]. Предполагается, что образование новых миелинизирующих олигодендроцитов является важным механизмом нейропластичности, что обусловлено их участием в регуляции гомеостаза ЦНС посредством влияния на глутаматергическую нейротрансмиссию. ОРС являются единственными глиальными клетками, которые имеют синаптические связи с нейронами. Синаптическая активность влияет на пролиферацию ОРС и их дифференцировку в зрелые олигодендроциты, которые дают начало образованию нового миеллина. ОРС активируются глутаматом, получаемым от нейронов, посредством экспрессии глутаматергических рецепторов (AMPA). Однако при дифференцировке ОРС в зрелые олигодендроциты плотность поверхностной экспрессии AMPA-рецепторов значительно снижается. Таким образом, кратковременная передача сигналов, опосредованная рецептором AMPA, важна для индукции дифференцировки ОРС и начала активной миелинизации аксонов [71]. Кроме того, вновь образованные олигодендроциты принимают важное участие в формировании и преобразовании глиальных рубцов [72]. После повреждения миеллина зрелые ОРС дифференцируются в олигодендроциты, способные к ремиелинизации аксонов и восстановлению почти нормальной нервной проводимости [73]. Подобно другим регенеративным реакциям, ремиелинизация наиболее эффективно протекает на ранних активных стадиях развития очагов демиелинизации, которые характеризуются обилием T- и B-лимфоцитов и макрофагов, содержащих продукты распада миеллина, и в которых часто выявляются ОРС, участвующие в формировании новых миелиновых оболочек; их плотность в этих зонах сопоставима с плотностью, обнаруживаемой в окружающем белом веществе. Напротив, в участках хронического воспаления зрелые миелинизирующие олиго-

дендроциты встречаются чрезвычайно редко, что, как предполагается, обусловлено блоком дифференцировки и остановкой развития ОРС на стадии преолигодендроцита [74]. Причины, по которым ОРС не могут пройти курс полной дифференцировки в зрелые олигодендроциты, вероятно, связаны с внутренними изменениями в популяции ОРС или специфическим изменением очагов при хронизации воспаления. Так, например, при прогрессирующих формах РС экспериментальное истощение иммунных клеток в очагах демиелинизации отрицательно влияет на процессы ремиелинизации по причине того, что сигналы, поступающие от этих клеток, являются движущей силой, стимулирующей активацию, рекрутинг и регуляцию дифференцировки ОРС [75]. В основном состояние неполной ремиелинизации и частичный глиоз очага демиелинизации наблюдаются при РС. Данное обстоятельство обусловлено тем, что при РС очаги демиелинизации претерпевают ряд изменений с течением времени. Первые изменения происходят, когда повышается проницаемость ГЭБ, внутрь ЦНС устремляются иммунные клетки, и воспалительный инфильтрат распределяется периваскулярно. В дальнейшем в очаг повреждения начинают поступать миелинизирующие олигодендроциты, которые инициируют восстановление миелина. В связи с уменьшением активации глиальных клеток и выработки медиаторов воспаления наблюдается восстановление экспрессии белков плотных контактов, а снижение экспрессии молекул адгезии на эндотелиоцитах препятствует проникновению активированных лимфоцитов в ЦНС. По мере угасания воспаления и восстановления целостности ГЭБ оставшиеся иммунные клетки перемещаются к периферии очага, где способствуют медленному расширению его краевой зоны и постепенному увеличению его размера. В этот период процессы глиоза начинают преобладать, в очаге можно наблюдать гипертрофированные астроциты, единичные миелинизирующие олигодендроциты, участки распада миелина и аксонопатию. Соответственно, аксоны, расположенные в подобных очагах, практически полностью лишены возможности ремиелинизации. Итак, по сути, в этой стадии демиелинизации формируется глиальный рубец, который можно визуализировать при МРТ. Такие очаги получили название «чёрных дыр», гипоинтенсивных на T1-взвешенных изображениях МРТ. Подобные очаги наблюдаются в основном на поздних прогрессирующих стадиях РС. Существует определённая корреляция между

количеством «чёрных дыр», нарастанием степени глобальной атрофии головного мозга и степенью инвалидизации [76]. Однако при ЗСОНМ и MOGAD редко происходит образование «чёрных дыр» вследствие отсутствия при этих заболеваниях хронического тлеющего нейровоспаления. Клинические проявления и последующее полное или неполное восстановление неврологических функций связано с тяжестью аутоиммунного демиелинизирующего процесса только в период обострения. При синдромах, ассоциированных с IgG-AQP4, в преобладающем числе случаев развивается вторичная тяжёлая демиелинизация, обусловленная структурной несостоятельностью ГЭБ и продукцией патогенных IgG-AQP4. При ЗСОНМ часто может встречаться кистозная трансформация участков демиелинизации в спинном мозге на месте бывших острых очагов, что, безусловно, приводит к тяжёлым неврологическим симптомам, которые даже в момент первой атаки заболевания могут привести к значимой инвалидизации [77]. В свою очередь, при MOGAD формирование «чёрных дыр» и кистозноподобных изменений в местах демиелинизации выявляется крайне редко и может сопровождать только тяжёлые ОРЭМ-подобные фенотипы с очень крупными очагами поражения миелина. В этом случае в центре очага, где долго персистирует воспаление, может сформироваться картина кистозной трансформации либо произойти появление гипоинтенсивного участка в T1-режиме при МРТ [78]. В большинстве случаев при MOGAD наблюдается практически полное исчезновение очагов или существенное уменьшение их размеров, что говорит в первую очередь о состоятельной ремиелинизации и, видимо, более лёгкой степени поражения миелина в целом. Наиболее часто у пациентов происходит полный регресс симптомов после лечения глюкокортикостероидами. Однако, несмотря на хорошее восстановление и достаточно благоприятный прогноз заболевания, более чем в 50–70 % случаев MOGAD имеет рецидивирующее течение, особенно у взрослых, что требует назначения терапии, предотвращающей обострения, в противном случае повторяющиеся обострения могут привести к крайне негативным последствиям в виде слепоты или двигательных нарушений [79].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытие новых антител значительно улучшило наши представления о патогенезе

воспалительных демиелинизирующих заболеваний ЦНС и позволило выделить новые нозологические единицы. MOGAD являются первыми демиелинизирующими заболеваниями ЦНС, для которых точно идентифицирован антиген и доказано, что антитела, вырабатываемые к MOG, являются патогенными. Трудности выявления MOG-IgG побудили исследователей к получению новых знаний о молекулярных и биохимических аспектах заболевания, что позволило более подробно изучить структуру MOG, частично выяснить механизмы взаимодействия MOG с антителами и показать сложность альтернативного сплайсинга гена *MOG*. Полученные на сегодняшний день данные должны лечь в основу улучшения диагностики заболевания. Несмотря на то, что MOGAD имеют более благоприятный прогноз по сравнению с другими демиелинизирующими заболеваниями, достаточно часто эти забо-

левания протекают с рецидивами. Кроме того, встречаются тяжёлые случаи MOGAD, в том числе и у детей, что требует неотложной терапии. Таким образом, целесообразно дальнейшее изучение различных аспектов заболевания для уточнения терапевтических мишеней и проведения многоцентровых рандомизированных исследований лекарственных препаратов, способных влиять на частоту обострений MOGAD.

Вклад авторов. Д.Д. Елисеева – написание статьи; М.Н. Захарова – редактирование текста 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

- Emery, B. (2010) Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination, *Science*, **330**, 779-782, doi: 10.1126/science.1190927.
- Saikali, P., Cayrol, R., and Vincent, T. (2009) Anti-aquaporin-4 auto-antibodies orchestrate the pathogenesis in neuromyelitis optica, *Autoimmun. Rev.*, **9**, 132-135, doi: 10.1016/j.autrev.2009.04.004.
- Graus, F., Titulaer, M. J., Balu, R., Benseler, S., Bien, C. G., Cellucci, T., Cortese, I., Dale, R. C., Gelfand, J. M., Geschwind, M., Glaser, C. A., Honnorat, J., Höftberger, R., Iizuka, T., Irani, S. R., Lancaster, E., Leypoldt, F., Prüss, H., Rae-Grant, A., Reindl, M., Rosenfeld, M. R., Rostásy, K., Saiz, A., Venkatesan, A., Vincent, A., Wandinger, K. P., Waters, P., and Dalmau, J. (2016) A clinical approach to diagnosis of autoimmune encephalitis, *Lancet Neurol.*, **15**, 391-404, doi: 10.1016/S1474-4422(15)00401-9.
- Yamout, B. I., and Alroughani, R. (2018) Multiple sclerosis, *Semin. Neurol.*, **38**, 212-225, doi: 10.1055/s-0038-1649502.
- Giovannoni, G., Popescu, V., Wuerfel, J., Hellwig, K., Iacobaeus, E., Jensen, M. B., García-Domínguez, J. M., Sousa, L., De Rossi, N., Hupperts, R., Fenu, G., Bodini, B., Kuusisto, H. M., Stankoff, B., Lycke, J., Airas, L., Granziera, C., and Scalfari, A. (2022) Smouldering multiple sclerosis: the “real MS”, *Ther. Adv. Neurol. Disord.*, **25**, 17562864211066751, doi: 10.1177/17562864211066751.
- McGinley, M. P., Goldschmidt, C. H., and Rae-Grant, A. D. (2021) Diagnosis and treatment of multiple sclerosis: a review, *JAMA*, **23**, 765-779, doi: 10.1001/jama.2020.26858.
- Lennon, V. A., Wingerchuk, D. M., Kryzer, T. J., Pittock, S. J., Lucchinetti, C. F., Fujihara, K., Nakashima, I., and Weinshenker, B. G. (2004) A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis, *Lancet*, **364**, 2106-2112, doi: 10.1016/S0140-6736(04)17551-X.
- Lennon, V. A., Kryzer, T. J., Pittock, S. J., Verkman, A. S., and Hinson, S. R. (2005) IgG marker of optic-spinal multiple sclerosis binds to the aquaporin-4 water channel, *J. Exp. Med.*, **202**, 473-477, doi: 10.1084/jem.20050304.
- Wingerchuk, D. M., Banwell, B., Bennett, J. L., Cabre, P., Carroll, W., Chitnis, T., de Seze, J., Fujihara, K., Greenberg, B., Jacob, A., et al. (2015) International consensus diagnostic criteria for neuromyelitis optica spectrum disorders, *Neurology*, **85**, 177-189, doi: 10.1212/WNL.0000000000001729.
- Jarius, S., and Wildemann, B. (2010) AQP4 antibodies in neuromyelitis optica: diagnostic and pathogenetic relevance, *Nat. Rev. Neurol.*, **6**, 383-392, doi: 10.1038/nrneurol.2010.72.
- Jarius, S., Metz, I., König, F. B., Ruprecht, K., Reindl, M., Paul, F., Bruck, W., and Wildemann, B. (2016) Screening for MOG-IgG and 27 other anti-glial and anti-neuronal autoantibodies in “pattern II multiple sclerosis” and brain biopsy findings in a MOG-IgG-positive case, *Multiple Sclerosis*, **22**, 1541-1549, doi: 10.1177/1352458515622986.
- Misu, T., Höftberger, R., Fujihara, K., Wimmer, I., Takai, Y., Nishiyama, S., Nakashima, I., Konno, H., Bradl, M., Garzuly, F., Itoyama, Y., Aoki, M., and Lassmann, H. (2013) Presence of six different lesion

- types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica, *Acta Neuropathol.*, **125**, 815-827, doi: 10.1007/s00401-013-1116-7.
13. Kaneko, K., Sato, D. K., Nakashima, I., Nishiyama, S., Tanaka, S., Marignier, R., Hyun, J. W., Oliveira, L. M., Reindl, M., Seifert-Held, T., Sepulveda, M., Siritho, S., Waters, P. J., Kurosawa, K., Akaishi, T., Kuroda, H., Misu, T., Prayoonwivat, N., Berger, T., Saiz, A., and Aoki, M. (2016) Myelin injury without astrocytopathy in neuroinflammatory disorders with MOG antibodies, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **87**, 1257-1259, doi: 10.1136/jnnp-2015-312676.
 14. Takai, Y., Misu, T., Kaneko, K., Chihara, N., Narikawa, K., Tsuchida, S., Nishida, H., Komori, T., Seki, M., Komatsu, T., Nakamagoe, K., Ikeda, T., Yoshida, M., Takahashi, T., Ono, H., Nishiyama, S., Kuroda, H., Nakashima, I., Suzuki, H., Bradl, M., et al. (2020) Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease: an immunopathological study, *Brain*, **143**, 1431-1446, doi: 10.1093/brain/awaa102.
 15. Jarius, S., Paul, F., Aktas, O., Asgari, N., Dale, R. C., de Seze, J., Franciotta, D., Fujihara, K., Jacob, A., Kim, H. J., Kleiter, I., Kümpfel, T., Levy, M., Palace, J., Ruprecht, K., Saiz, A., Trebst, C., Weinschenker, B. G., and Wildemann, B. (2018) MOG encephalomyelitis: international recommendations on diagnosis and antibody testing, *J. Neuroinflamm.*, **15**, 134, doi: 10.1186/s12974-018-1144-2.
 16. Banwell, B., Bennett, J. L., Marignier, R., Kim, H. J., Brilot, F., Flanagan, E. P., Ramanathan, S., Waters, P., Tenenbaum, S., Graves, J. S., Chitnis, T., Brandt, A. U., Hemingway, C., Neuteboom, R., Pandit, L., Reindl, M., Saiz, A., Sato, D. K., Rostasy, K., Paul, F., and Palace, J. (2023) Diagnosis of myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease: International MOGAD Panel proposed criteria, *Lancet Neurol.*, **22**, 268-282, doi: 10.1016/S1474-4422(22)00431-8.
 17. Baumann, N., and Pham-Dinh, D. (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system, *Physiol. Rev.*, **81**, 871-927, doi: 10.1152/physrev.2001.81.2.871.
 18. Quarles, R. H. (2002) Myelin sheaths: glycoproteins involved in their formation, maintenance and degeneration, *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 1851-1871, doi: 10.1007/pl00012510.
 19. Lebar, R., Boutry, J. M., Vincent, C., Robineaux, R., and Voisin, G. A. (1976) Studies on autoimmune encephalomyelitis in the guinea pig. II. An in vitro investigation on the nature, properties, and specificity of the serum-demyelinating factor, *J. Immunol.*, **116**, 1439-1446.
 20. Von Büdingen, H. C., Hauser, S. L., Fuhrmann, A., Nabavi, C. B., Lee, J. I., and Genain, C. P. (2002) Molecular characterization of antibody specificities against myelin/oligodendrocyte glycoprotein in autoimmune demyelination, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8207-8212, doi: 10.1073/pnas.122092499.
 21. Campagnoni, A. T., and Skoff, R. P. (2001) The pathobiology of myelin mutants reveal novel biological functions of the MBP and PLP genes, *Brain Pathol.*, **11**, 74-91, doi: 10.1111/j.1750-3639.2001.tb00383.x.
 22. Slavin, A. J., Johns, T. G., Orian, J. M., and Bernard, C. C. (1997) Regulation of myelin oligodendrocyte glycoprotein in different species throughout development, *Dev. Neurosci.*, **19**, 69-78, doi: 10.1159/000111187.
 23. Kroepfl, J. F., Viise, L. R., Charron, A. J., Lington, C., and Gardinier, M. V. (1996) Investigation of myelin/oligodendrocyte glycoprotein membrane topology, *J. Neurochem.*, **67**, 2219-2222, doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.67052219.x.
 24. Bettadapura, J., Menon, K. K., Moritz, S., Liu, J., and Bernard, C. C. (1998) Expression, purification, and encephalitogenicity of recombinant human myelin oligodendrocyte glycoprotein, *J. Neurochem.*, **70**, 1593-1599, doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.70041593.x.
 25. Koukoulitsa, C., Chontzopoulou, E., Kiriakidi, S., Tzakos, A. G., and Mavromoustakos, T. (2020) A journey to the conformational analysis of T-cell epitope peptides involved in multiple sclerosis, *Brain Sci.*, **10**, 356, doi: 10.3390/brainsci10060356.
 26. Breithaupt, C., Schäfer, B., Pellkofer, H., Huber, R., Lington, C., and Jacob, U. (2008) Demyelinating myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific autoantibody response is focused on one dominant conformational epitope region in rodents, *J. Immunol.*, **181**, 1255-1263, doi: 10.4049/jimmunol.181.2.1255.
 27. Bittner, S., Afzali, A. M., Wiendl, H., and Meuth, S. G. (2014) Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in C57BL/6 mice, *J. Vis. Exp.*, **86**, 51275, doi: 10.3791/51275.
 28. Peschl, P., Schanda, K., Zeka, B., Given, K., Böhm, D., Ruprecht, K., Saiz, A., Lutterotti, A., Rostásy, K., Höftberger, R., Berger, T., Macklin, W., Lassmann, H., Bradl, M., Bennett, J. L., and Reindl, M. (2017) Human antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein can cause complement-dependent demyelination, *J. Neuroinflamm.*, **14**, 208, doi: 10.1186/s12974-017-0984-5.
 29. Mayer, M. C., Breithaupt, C., Reindl, M., Schanda, K., Rostásy, K., Berger, T., Dale, R. C., Brilot, F., Olsson, T., Jenne, D., Pröbstel, A. K., Dornmair, K., Wekerle, H., Hohlfeld, R., Banwell, B., Bar-Or, A., and Meinl, E. (2013) Distinction and temporal stability of conformational epitopes on myelin oligodendrocyte glycoprotein recognized by patients with different inflammatory central nervous system diseases, *J. Immunol.*, **191**, 3594-3604, doi: 10.4049/jimmunol.1301296.
 30. Mayer, M. C., and Meinl, E. (2012) Glycoproteins as targets of autoantibodies in CNS inflammation: MOG

- and more, *Ther. Adv. Neurol. Disord.*, **5**, 147-159, doi: 10.1177/1756285611433772.
31. Ramya, L. (2020) Role of N-glycan in the structural changes of myelin oligodendrocyte glycoprotein and its complex with an antibody, *J. Biomol. Struct. Dynamics*, **38**, 1649-1658, doi: 10.1080/07391102.2019.1614999.
 32. Marti Fernandez, I., Macrini, C., Krumbholz, M., Hensbergen, P. J., Hipgrave Ederveen, A. L., Winklmeier, S., Vural, A., Kurne, A., Jenne, D., Kamp, F., Gerdes, L. A., Hohlfeld, R., Wuhrer, M., Kümpfel, T., and Meinl, E. (2019) The glycosylation site of myelin oligodendrocyte glycoprotein affects autoantibody recognition in a large proportion of patients, *Front. Immunol.*, **10**, 1189, doi: 10.3389/fimmu.2019.01189.
 33. Ambrosius, W., Michalak, S., Kozubski, W., and Kalinowska, A. (2020) Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease: current insights into the disease pathophysiology, diagnosis and management, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 100, doi: 10.3390/ijms22010100.
 34. Barkovich, A. J. (2000) Concepts of myelin and myelination in neuroradiology, *Am. J. Neuroradiol.*, **21**, 1099-1109.
 35. Dale, R. C., Tantsis, E. M., Merheb, V., Kumaran, R. Y., Sinmaz, N., Pathmanandavel, K., Ramanathan, S., Booth, D. R., Wienholt, L. A., Prelog, K., Clark, D. R., Guillemin, G. J., Lim, C. K., Mathey, E. K., and Brilot, F. (2014) Antibodies to MOG have a demyelination phenotype and affect oligodendrocyte cytoskeleton, *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.*, **1**, e12, doi: 10.1212/NXI.0000000000000012.
 36. Johns, T. G., and Bernard, C. C. (1999) The structure and function of myelin oligodendrocyte glycoprotein, *J. Neurochem.*, **72**, 1-9, doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0720001.x.
 37. Morise, J., Takematsu, H., and Oka, S. (2017) The role of human natural killer-1 (HNK-1) carbohydrate in neuronal plasticity and disease, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 2455-2461, doi: 10.1016/j.bbagen.2017.06.025.
 38. Pham-Dinh, D., Mattei, M. G., Nussbaum, J. L., Roussel, G., Pontarotti, P., Roeckel, N., Mather, I. H., Artzt, K., Lindahl, K. F., and Dautigny, A. (1993) Myelin/oligodendrocyte glycoprotein is a member of a subset of the immunoglobulin superfamily encoded within the major histocompatibility complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7990-7994, doi: 10.1073/pnas.90.17.7990.
 39. Delarasse, C., Della Gaspera, B., Lu, C. W., Lachapelle, F., Gelot, A., Rodriguez, D., Dautigny, A., Genain, C., and Pham-Dinh, D. (2006) Complex alternative splicing of the myelin oligodendrocyte glycoprotein gene is unique to human and non-human primates, *J. Neurochem.*, **98**, 1707-1717, doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04053.
 40. Spadaro, M., Winklmeier, S., Beltrán, E., Macrini, C., Höftberger, R., Schuh, E., Thaler, F. S., Gerdes, L. A., Laurent, S., Gerhards, R., Brändle, S., Dornmair, K., Breithaupt, C., Krumbholz, M., Moser, M., Krishnamoorthy, G., Kamp, F., Jenne, D., Hohlfeld, R., Kümpfel, T., and Meinl, E. (2018) Pathogenicity of human antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein, *Ann. Neurol.*, **84**, 315-328, doi: 10.1002/ana.25291.
 41. Reindl, M., and Waters, P. (2019) Myelin oligodendrocyte glycoprotein antibodies in neurological disease, *Nat. Rev. Neurol.*, **15**, 89-102, doi: 10.1038/s41582-018-0112-x.
 42. Kwon, Y. N., Kim, B., Kim, J. S., Mo, H., Choi, K., Oh, S. I., Kim, J. E., Nam, T. S., Sohn, E. H., Heo, S. H., Kim, S. B., Park, K. C., Yoon, S. S., Oh, J., Baek, S. H., Kim, B. J., Park, K. S., Sung, J. J., Jung, J. H., Kim, S. J., and Kim, S. M. (2021) Myelin oligodendrocyte glycoprotein-immunoglobulin G in the CSF: clinical implication of testing and association with disability, *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.*, **9**, e1095, doi: 10.1212/NXI.0000000000001095.
 43. Pujol, J., Soriano-Mas, C., Ortiz, H., Sebastián-Gallés, N., Losilla, J. M., and Deus, J. (2006) Myelination of language-related areas in the developing brain, *Neurology*, **66**, 339-343, doi: 10.1212/01.wnl.0000201049.66073.8d.
 44. Mathisen, P. M., Kawczak, J. A., Yu, M., Johnson, J. M., and Tuohy, V. K. (2001) Differential DM20 mRNA expression distinguishes two distinct patterns of spontaneous recovery from murine autoimmune encephalomyelitis, *J. Neurosci. Res.*, **64**, 542-551, doi: 10.1002/jnr.1106.
 45. Allamargot, C., and Gardinier, M. V. (2007) Alternative isoforms of myelin/oligodendrocyte glycoprotein with variable cytoplasmic domains are expressed in human brain, *J. Neurochem.*, **101**, 298-312, doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04296.x.
 46. Schanda, K., Peschl, P., Lerch, M., Seebacher, B., Mindorf, S., Ritter, N., Probst, M., Hegen, H., Di Pauli, F., Wendel, E. M., Lechner, C., Baumann, M., Mariotto, S., Ferrari, S., Saiz, A., Farrell, M., Leite, M., Irani, S. R., Palace, J., Lutterotti, A., and Reindl, M. (2021) Differential binding of autoantibodies to MOG isoforms in inflammatory demyelinating diseases, *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.*, **8**, e1027, doi: 10.1212/NXI.0000000000001027.
 47. Eichinger, A., Neumaier, I., and Skerra, A. (2021) The extracellular region of bovine milk butyrophilin exhibits closer structural similarity to human myelin oligodendrocyte glycoprotein than to immunological BTN family receptors, *Biol. Chem.*, **402**, 1187-1202, doi: 10.1515/hsz-2021-0122.
 48. Jurynczyk, M., Messina, S., Woodhall, M. R., Raza, N., Everett, R., Roca-Fernandez, A., Tackley, G., Hamid, S., Sheard, A., Reynolds, G., Chandratre, S., Hemingway, C., Jacob, A., Vincent, A., Leite, M. I., Waters, P., and Palace, J. (2017) Clinical presentation and prognosis in MOG-antibody disease: a UK study, *Brain*, **140**, 3128-3138, doi: 10.1093/brain/awx276.

49. Marignier, R., Hacothen, Y., Cobo-Calvo, A., Pröbstel, A. K., Aktas, O., Alexopoulos, H., Amato, M. P., Asgari, N., Banwell, B., Bennett, J., Brilot, F., Capobianco, M., Chitnis, T., Ciccarelli, O., Deiva, K., De Sèze, J., Fujihara, K., Jacob, A., Kim, H. J., Kleiter, I., et al. (2021) Myelin-oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease, *Lancet Neurol.*, **20**, 762-772, doi: 10.1016/S1474-4422(21)00218-0.
50. Bournazos, S., Wang, T. T., Dahan, R., Maamary, J., and Ravetch, J. V. (2017) Signaling by antibodies: recent progress, *Ann. Rev. Immunol.*, **35**, 285-311, doi: 10.1146/annurev-immunol-051116-052433.
51. Wang, T. T., and Ravetch, J. V. (2019) Functional diversification of IgGs through Fc glycosylation, *J. Clin. Invest.*, **129**, 3492-3498, doi: 10.1172/JCI130029.
52. Spatola, M., Chuquisana, O., Jung, W., Lopez, J. A., Wendel, E. M., Ramanathan, S., Keller, C. W., Hahn, T., Meinel, E., Reindl, M., Dale, R. C., Wiendl, H., Lauffenburger, D. A., Rostásy, K., Brilot, F., Alter, G., and Lünemann, J. D. (2023) Humoral signatures of MOG-antibody-associated disease track with age and disease activity, *Cell Rep. Med.*, **4**, 100913, doi: 10.1016/j.xcrm.2022.100913.
53. Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H., and Presta, L. G. (2002) Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity, *J. Biol. Chem.*, **277**, 26733-26740, doi: 10.1074/jbc.M202069200.
54. Gudelj, I., Lauc, G., and Pezer, M. (2018) Immunoglobulin G glycosylation in aging and diseases, *Cell. Immunol.*, **333**, 65-79, doi: 10.1016/j.cellimm.2018.07.009.
55. Mony, J. T., Khoroshii, R., and Owens, T. (2014) MOG extracellular domain (p1-125) triggers elevated frequency of CXCR3⁺ CD4⁺ Th1 cells in the CNS of mice and induces greater incidence of severe EAE, *Multiple Sclerosis*, **20**, 1312-1321, doi: 10.1177/1352458514524086.
56. Oliveira, L. M., Apóstolos-Pereira, S. L., Pitombeira, M. S., Bruel Torretta, P. H., Callegaro, D., and Sato, D. K. (2019) Persistent MOG-IgG positivity is a predictor of recurrence in MOG-IgG-associated optic neuritis, encephalitis and myelitis, *Multiple Sclerosis*, **25**, 1907-1914, doi: 10.1177/1352458518811597.
57. Quast, I., Keller, C. W., Maurer, M. A., Giddens, J. P., Tackenberg, B., Wang, L. X., Münz, C., Nimmerjahn, F., Dalakas, M. C., and Lünemann, J. D. (2015) Sialylation of IgG Fc domain impairs complement-dependent cytotoxicity, *J. Clin. Invest.*, **125**, 4160-4170, doi: 10.1172/JCI182695.
58. Seeling, M., Brückner, C., and Nimmerjahn, F. (2017) Differential antibody glycosylation in autoimmunity: sweet biomarker or modulator of disease activity? *Nat. Rev. Rheumatol.*, **13**, 621-630, doi: 10.1038/nrrheum.2017.146.
59. Reindl, M., Schanda, K., Woodhall, M., Tea, F., Ramanathan, S., Sagen, J., Fryer, J. P., Mills, J., Teegen, B., Mindorf, S., Ritter, N., Krummrei, U., Stöcker, W., Eggert, J., Flanagan, E. P., Ramberger, M., Hegen, H., Rostasy, K., Berger, T., Leite, M. I., and Waters, P. (2020) International multicenter examination of MOG antibody assays, *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.*, **7**, e674, doi: 10.1212/NXI.0000000000000674.
60. Kaneko, K., Sato, D. K., Nakashima, I., Ogawa, R., Akaishi, T., Takai, Y., Nishiyama, S., Takahashi, T., Misu, T., Kuroda, H., Tanaka, S., Nomura, K., Hashimoto, Y., Callegaro, D., Steinman, L., Fujihara, K., and Aoki, M. (2018) CSF cytokine profile in MOG-IgG⁺ neurological disease is similar to AQP4-IgG⁺ NMOSD but distinct from MS: a cross-sectional study and potential therapeutic implications, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **89**, 927-936, doi: 10.1136/jnnp-2018-317969.
61. Fujihara, K., Bennett, J. L., de Seze, J., Hara-mura, M., Kleiter, I., Weinschenker, B. G., Kang, D., Mughal, T., and Yamamura, T. (2020) Interleukin-6 in neuromyelitis optica spectrum disorder pathophysiology, *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm.*, **7**, e841, doi: 10.1212/NXI.0000000000000841.
62. Traboulsee, A., Greenberg, B. M., Bennett, J. L., Szczechowski, L., Fox, E., Shkrobot, S., Yamamura, T., Terada, Y., Kawata, Y., Wright, P., Gianella-Borradori, A., Garren, H., and Weinschenker, B. G. (2020) Safety and efficacy of satralizumab monotherapy in neuromyelitis optica spectrum disorder: a randomised, double-blind, multicentre, placebo-controlled phase 3 trial, *Lancet Neurol.*, **19**, 402-412, doi: 10.1016/S1474-4422(20)30078-8.
63. Khalil, M., Teunissen, C. E., Otto, M., Piehl, F., Sormani, M. P., Gattringer, T., Barro, C., Kappos, L., Comabella, M., Fazekas, F., Petzold, A., Blennow, K., Zetterberg, H., and Kuhle, J. (2018) Neurofilaments as biomarkers in neurological disorders, *Nat. Rev. Neurol.*, **14**, 577-589, doi: 10.1038/s41582-018-0058-z.
64. Bozzetti, S., Ferrari, S., Gajofatto, A., and Mariotto, S. (2021) Neurofilament light chain in demyelinating conditions of the central nervous system: a promising biomarker, *Neuroimmunol. Neuroinflamm.*, **8**, 1-13, doi: 10.20517/2347-8659.2020.26.
65. Watanabe, M., Nakamura, Y., Michalak, Z., Isobe, N., Barro, C., Leppert, D., Matsushita, T., Hayashi, F., Yamasaki, R., Kuhle, J., and Kira, J. I. (2019) Serum GFAP and neurofilament light as biomarkers of disease activity and disability in NMOSD, *Neurology*, **93**, e1299-e1311, doi: 10.1212/WNL.00000000000008160.
66. Mariotto, S., Gastaldi, M., Grazian, L., Mancinelli, C., Capra, R., Marignier, R., Alberti, D., Zanzoni, S., Schanda, K., Franciotta, D., Calabria, F., Monaco, S., Reindl, M., Ferrari, S., and Gajofatto, A. (2021) NfL levels predominantly increase at disease onset in MOG-Abs-associated disorders, *Multiple*

- Scleros. Related Disord.*, **50**, 102833, doi: 10.1016/j.msard.2021.102833.
67. Franklin, R. J., and Goldman, S. A. (2015) Glia disease and repair-remyelination, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **7**, a020594, doi: 10.1101/cshperspect.a020594.
 68. Mitew, S., Hay, C. M., Peckham, H., Xiao, J., Koenning, M., Emery, B. (2014) Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin, *Neuroscience*, **276**, 29-47, doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.11.029.
 69. Clarke, L. E., Young, K. M., Hamilton, N. B., Li, H., Richardson, W. D., and Attwell, D. (2012) Properties and fate of oligodendrocyte progenitor cells in the corpus callosum, motor cortex, and piriform cortex of the mouse, *J. Neurosci.*, **32**, 8173-8185, doi: 10.1523/jneurosci.0928-12.2012.
 70. McTigue, D. M., Wei, P., and Stokes, B. T. (2001) Proliferation of NG2-positive cells and altered oligodendrocyte numbers in the contused rat spinal cord, *J. Neurosci.*, **21**, 3392-3400, doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-10-03392.2001.
 71. Birey, F., Kloc, M., Chavali, M., Hussein, I., Wilson, M., Christoffel, D. J., Chen, T., Frohman, M. A., Robinson, J. K., Russo, S. J., Maffei, A., and Aguirre, A. (2015) Genetic and stress-induced loss of NG2 glia triggers emergence of depressive-like behaviors through reduced secretion of FGF2, *Neuron*, **88**, 941-956, doi: 10.1016/j.neuron.2015.10.046.
 72. Hughes, E. G., Kang, S. H., Fukaya, M., and Bergles, D. E. (2013) Oligodendrocyte progenitors balance growth with self-repulsion to achieve homeostasis in the adult brain, *Nat. Neurosci.*, **16**, 668-676, doi: 10.1038/nn.3390.
 73. Zawadzka, M., Rivers, L. E., Fancy, S. P., Zhao, C., Tripathi, R., Jamen, F., Young, K., Goncharevich, A., Pohl, H., Rizzi, M., Rowitch, D. H., Kessaris, N., Suter, U., Richardson, W. D., and Franklin, R. J. (2010) CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination, *Cell Stem Cell*, **6**, 578-590, doi: 10.1016/j.stem.2010.04.002.
 74. Kuhlmann, T., Miron, V., Cui, Q., Wegner, C., Antel, J., and Brück, W. (2008) Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis, *Brain*, **131**, 1749-1758, doi: 10.1093/brain/awn096.
 75. Foote, A. K., and Blakemore, W. F. (2005) Inflammation stimulates remyelination in areas of chronic demyelination, *Brain*, **128**, 528-539, doi: 10.1093/brain/awh417.
 76. Kuhlmann, T., Ludwin, S., Prat, A., Antel, J., Brück, W., and Lassmann, H. (2017) An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions, *Acta Neuropathol.*, **133**, 13-24, doi: 10.1007/s00401-016-1653-y.
 77. Kawachi, I., and Lassmann, H. (2017) Neurodegeneration in multiple sclerosis and neuromyelitis optica, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **88**, 137-145, doi: 10.1136/jnnp-2016-313300.
 78. Denève, M., Biotti, D., Patsoura, S., Ferrier, M., Meluchova, Z., Mahieu, L., Heran, F., Vignal, C., Deschamps, R., Gout, O., Champfleury, N. M., Ayrignac, X., Dallièrre, C. C., Labauge, P., Dulau, C., Tourdias, T., Dumas, H., Cognard, C., Brassat, D., and Bonneville, F. (2019) MRI features of demyelinating disease associated with anti-MOG antibodies in adults, *J. Neuroradiol.*, **46**, 312-318, doi: 10.1016/j.neurad.2019.06.001.
 79. Ramanathan, S., Mohammad, S., Tantsis, E., Nguyen, T. K., Merheb, V., Fung, V. S. C., White, O. B., Broadley, S., Lechner-Scott, J., Vucic, S., Henderson, A. P. D., Barnett, M. H., Reddel, S. W., Brilot, F., Dale, R. C., and Australasian and New Zealand MOG Study Group (2018) Clinical course, therapeutic responses and outcomes in relapsing MOG antibody-associated demyelination, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **89**, 127-137, doi: 10.1136/jnnp-2017-316880.

MYELIN OLYGODENDROCYTE GLYCOPROTEIN – AUTOANTIGEN IN INFLAMMATORY DEMYELINATING DISEASES OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM

Review

D. D. Eliseeva* and M. N. Zakharova

Research Center of Neurology, 125367 Moscow, Russia; e-mail: ddeliseeva@gmail.com

Demyelinating diseases of the CNS are a result of an autoimmune attack to the myelin sheaths surrounding axons. Their structural proteins become antigenic and as a result, myelin lesions appear. The identification of specific antibodies directed against the components of myelin, using highly specialized methods of

laboratory diagnostics, can significantly improve diagnostic approaches. Currently, myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody-associated disease (MOGAD) consists of demyelinating syndromes with an identified antigen. The pathogenic role of human MOG-IgG has been demonstrated, which makes it possible to isolate this disease into a separate nosological form. However, for the myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) gene, alternative splicing can produce various isoforms, which hinders antigen detection even for the most advanced techniques of immunofluorescence analysis. On the other hand, MOG conformational changes provide the structural integrity of other myelin proteins and maintain immune autotolerance mechanisms that are unique to humans.

Keywords: demyelinating diseases, myelin oligodendrocyte glycoprotein, antibodies, alternative splicing

Уважаемые читатели!

К публикации готовится специальный номер, посвященный биохимии раковых клеток («Биохимия», выпуск 7, 2023).

Приглашённый редактор – Вадим С. Покровский (Национальный медицинский исследовательский онкологический центр имени Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации, 115478 Москва, Россия; Научно-исследовательский институт молекулярной и клеточной медицины Российского университета дружбы народов (РУДН), 117198 Москва, Россия).