

ISSN 1027-8133

Том 40, Номер 4

Октябрь - Ноябрь - Декабрь
2023



НЕЙРОХИМИЯ



www.sciencejournals.ru



СОДЕРЖАНИЕ

Том 40, номер 4, 2023

Вклад ученых Сибири в нейрохимию России

(спецвыпуск, часть 2)

Редакторы Б. М. Доронин, Н. Н. Дыгало, Н. Г. Колосова

Регулярные статьи

Обзоры

Некоторые современные биомаркеры нейродегенеративных расстройств:
фокус на цистатин С

*Т. А. Короленко, А. Б. Пупышев, В. М. Беличенко,
М. А. Тихонова, Т. Г. Амстиславская*

309

Множественные механизмы терапевтического эффекта трегалозы
в торможении экспериментальной нейродегенерации

А. Б. Пупышев, Т. А. Короленко, М. А. Тихонова

317

Роль VEGF в ангиогенезе и моторном восстановлении после ишемического инсульта

К. С. Кучерова, Е. С. Королёва, В. М. Алифирова

331

Экспериментальные работы

Центральные эффекты периферически введенных иммунных клеток,
модулированных оригинальным антиконвульсантом,
при экспериментальном алкоголизме

Е. В. Маркова, И. В. Савкин, Е. В. Серенко, М. А. Княжева, Ю. А. Шевченко

338

Клиническая нейрохимия

Роль неспецифического воспаления при развитии диабетической полинейропатии

Л. А. Щепанкевич, М. А. Первунинская

348

Экзосомы и микровезикулы в функционировании нервной системы в норме и при патологии

(спецвыпуск)

Редактор А. А. Яковлев

Обзоры

Структурные детерминанты малых внеклеточных везикул (экзосом) и их роль
в осуществлении биологических функций

А. М. Турчинец, А. А. Яковлев

353

State-of-the-art: применение внеклеточных везикул и препаратов на их основе
для нейропротекции и стимуляции регенерации
ткани головного мозга после повреждения

*Н. А. Басалова, С. С. Джауари, Ю. А. Юршев, А. Л. Примак,
А. Ю. Ефименко, В. А. Ткачук, М. Н. Карагяур*

367

Клиническая нейрохимия

Повышенный уровень малых внеклеточных везикул в сыворотке крови больных депрессией, эпилепсией и эпилепсией с депрессией

*А. А. Яковлев, Т. А. Дружкова, А. Стефанович, Ю. В. Моисеева,
Н. А. Лазарева, М. С. Зинчук, Ф. К. Ридер, А. Б. Гехт, Н. В. Гуляева* 381

Количественные характеристики малых внеклеточных везикул из крови пациентов с несуйцидальным самоповреждением

*И. Н. Мишин, М. С. Зинчук, Т. А. Дружкова,
Н. В. Гуляева, А. Б. Гехт, А. А. Яковлев* 396

Регулярные статьи

Обзоры

Аномалии энергетического метаболизма при шизофрении и возможные патогенетически-ориентированные терапевтические подходы

*И. С. Бокша, Т. А. Прохорова, О. К. Савушкина,
Е. Б. Терешкина, Е. А. Воробьева, Г. Ш. Бурбаева* 406

T-Клеточные аспекты развития некоторых неврологических заболеваний

А. А. Квичанский, А. П. Большаков 423

Экспериментальные работы

Индукция холинергического фенотипа в клетках нейробластомы мыши фактором роста нервов

*А. А. Корягина, О. А. Недогреева, А. А. Буянова, Ю. С. Спивак,
А. П. Большаков, Н. В. Гуляева, М. Ю. Степаничев* 435

Клиническая нейрохимия

Меланхолическая депрессия сопровождается повышенным уровнем фактора роста нервов в сыворотке крови

М. Г. Узбеков, С. Н. Шихов, В. В. Крюков, В. В. Бриллиантова, В. Н. Краснов 446

Contents

Vol. 40, no. 4, 2023

The Contribution of Siberian Scientists to the Neurochemistry of Russia

(Special Issue, Part 2)

Eds. B. M. Doronin, N. N. Dygalo, and N. G. Kolosova

Review Articles

Some Advanced Biomarkers of Neurodegenerative Disorders: focus on Cystatin C

*T. A. Korolenko, A. B. Pupyshv, V. M. Belichenko,
M. A. Tikhonova, and T. G. Amstislavskaya*

309

Multiple Mechanisms of the Therapeutic Effect of Trehalose in Inhibition of Experimental Neurodegeneration

A. B. Pupyshv, T. A. Korolenko, and M. A. Tikhonova

317

Role of VEGF in Angiogenesis and Motor Recovery after Ischemic Stroke

K. S. Kucheroval, E. S. Koroleval, and V. M. Alifiroval

331

Experimental Articles

Central Effects of Peripherically Introduced Immune Cells Modulated by an Original Anticonvulsant in Experimental Alcoholism

E. V. Markoval, I. V. Savkin, E. V. Serenko, M. A. Knyazheval, and Yu. A. Shevchenko

338

Clinical Neurochemistry

The Role of Nonspecific Inflammation in the Development of Diabetic Polyneuropathy

L. A. Shchepankevich and M. A. Pervuninskaya

348

Exosomes and Microvesicles in the Functioning of the Nervous System in Normal and Pathological Conditions

(Special Issue)

Ed. A. A. Yakovlev

Review Articles

Structural Determinants of Small Extracellular Vesicles (Exosomes) and Their Role in Biological Functions

A. M. Tourchinets and A. A. Yakovlev

353

State-of-the-Art: the Use of Extracellular Vesicles and Preparations Based on Them for Neuroprotection and Stimulation of Brain Tissue Regeneration after Injury

*N. A. Basaloval, S. S. Dzhauari, Yu. A. Yurshev, A. L. Primak,
A. Yu. Efimenko, V. A. Tkachuk, and M. N. Karagyaur*

367

Clinical Neurochemistry

Elevated Level of Small Extracellular Vesicles in the Serum of Patients with Depression, Epilepsy and Epilepsy with Depression

A. A. Yakovlev, T. A. Druzhkova, A. Stefanovich, Yu. V. Moiseeva, N. A. Lazareva, M. S. Zinchuk, F. K. Rider, A. B. Guekht, and N. V. Gulyaeva

381

Quantitative Characteristics of Small Extracellular Vesicles from the Blood of Patients with Non-Suicidal Self-Harm

I. N. Mishin, M. S. Zinchuk, T. A. Druzhkova, N. V. Gulyaeva, A. B. Guekht, and A. A. Yakovlev

396

Regular Articles

Review Articles

Anomalies of Energy Metabolism in Schizophrenia and Possible Pathogenetic-Targeted Therapeutic Approaches

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

406

T-Cell Aspects of Some Neurological Diseases

A. A. Kvichansky and A. P. Bolshakov

423

Experimental Articles

Induction of Cholinergic Phenotype in Mouse Neuroblastoma Cells Using Nerve Growth Factor

A. A. Koryagina, O. A. Nedogreeva, A. A. Buyanova, Yu. S. Spivak, A. P. Bolshakov, N. V. Gulyaeva, and M. Yu. Stepanichev

435

Clinical Neurochemistry

Melancholic Depression is Followed by the Increased Serum Nerve Growth Factor Level

M. G. Uzbekov, S. N. Shikhov, V. V. Krjukov, V. V. Brilliantova, and V. N. Krasnov

446

НЕКОТОРЫЕ СОВРЕМЕННЫЕ БИОМАРКЕРЫ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ РАССТРОЙСТВ: ФОКУС НА ЦИСТАТИН С

© 2023 г. Т. А. Короленко¹*, А. Б. Пупышев¹, В. М. Беличенко¹,
М. А. Тихонова¹, Т. Г. Амтиславская^{1,2}

¹Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины, Новосибирск, Россия

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 03.03.2023 г.

После доработки 04.05.2023 г.

Принята к публикации 05.05.2023 г.

Поиск биологических маркеров нейродегенеративных заболеваний, а именно болезни Альцгеймера и Паркинсона, является актуальной проблемой для фундаментальной биологии и современной медицины. Целью данного обзора было представление некоторых новых результатов по биомаркерам этих нейродегенеративных заболеваний, в основном в биологических жидкостях, таких как плазма и спинномозговая жидкость. Новыми биомаркерами болезни Альцгеймера являются амилоид- β и фосфорилированный тау в плазме крови, а также ПЭТ (позитронно-эмиссионная томография); они имеют большие перспективы для экспериментальных и клинических исследований. В отношении болезни Паркинсона нашли, что уровни цистатина С и гомоцистеина в сыворотке крови пациентов с болезнью Паркинсона были выше, чем в сыворотке крови контрольной группы, и было предложено рассматривать их как новые биомаркеры нейровоспаления. Цистатин С в биологических жидкостях предлагался в качестве перспективного биомаркера для диагностики болезни Паркинсона. В последнее время внеклеточные везикулы (экзосомы) стали новым материалом в области биомаркеров. Являясь транспортными средствами межклеточных взаимодействий, они могут считаться многообещающими носителями биомаркеров заболеваний, в том числе нейродегенеративных расстройств. На сегодняшний день поиск перспективных маркеров и подходов к лечению нейродегенеративных заболеваний представляется чрезвычайно актуальной задачей, требующей глобальных решений и инновационных подходов.

Ключевые слова: нейродегенерация, биомаркеры, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, цистатин С, экзосомы

DOI: 10.31857/S102781332304012X, **EDN:** SXPMKQ

ВВЕДЕНИЕ

Термин “биомаркер”, сокращение от “биологического маркера”, относится к широкой группе медицинских признаков, объективных показателей состояния здоровья, наблюдаемых у пациента, которые могут быть точно и надежно измерены [1]. Поиск биомаркеров для таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Альцгеймера (БА) и болезнь Паркинсона (БП), был серьезной проблемой для лабораторной и клинической медицины и, как показали последние результаты, биомаркеров становится все больше [2–4]. Содержание в крови амилоида- β (А β) и фосфорилированных белков тау, связанное с их соответствующими концентрациями в спинномозговой жидкости и с амилоид-ПЭТ (позитронно-эмиссионной томо-

графией) или тау-ПЭТ сканированием, было одной из первых диагностированных находок при БА [5]. Наиболее широко используемыми биомаркерами спинномозговой жидкости при болезни Альцгеймера являются пептид А β 42 (основной компонент амилоидных бляшек в мозге), тау и фосфорилированный тау (основные компоненты клубков тау в мозге, которые являются еще одним отличительным признаком болезни Альцгеймера). В этом обзоре мы попытались представить некоторые последние данные о биомаркерах наиболее изученных нейродегенеративных заболеваний – БА и БП.

БОЛЕЗНЬ АЛЬЦГЕЙМЕРА

БА связана с когнитивными нарушениями и дегенерацией синапсов, которые, как предполагается, являются ранним событием в формирова-

* Адресат для корреспонденции: 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 4, e-mail: korolenkota@neuronm.ru.

нии этого заболевания [6, 7]. БА – это прогрессирующее, клинически разнородное и чрезвычайно сложное нейродегенеративное заболевание, характеризующееся снижением когнитивных способностей. В последние два десятилетия наблюдается значительный рост исследований биомаркеров спинномозговой жидкости (СМЖ) при БА [5, 8]. Амилоидная гипотеза БА долгое время была доминирующей теорией, предполагающей, что БА вызвана накоплением в мозге белка А β , что приводит к интоксикации нейронов центральной нервной системы [8, 9]. Амилоидная гипотеза была пересмотрена в связи со спорадическими вариантами БА. Frisoni et al. [9] предложили вероятностную модель БА, в которой три варианта БА (аутосомно-доминантный, спорадический, связанный с АРОЕ $\epsilon 4$, и спорадический, не связанный с АРОЕ $\epsilon 4$) характеризуются снижением пенетрантности и уменьшением роли амилоидного каскада и увеличением роли стохастических факторов (воздействия окружающей среды и генов низкого риска). Самая ранняя фаза БА (клеточная фаза) происходит с накоплением А β параллельно с нарастанием патогенного тау [3]. Риск развития БА на 60–80% зависит от наследственных факторов, при этом уже выявлено более 40 генетических локусов риска, связанных с БА, среди которых АРОЕ аллели имеют самую сильную связь с заболеванием [10]. Некоторые биомаркеры включают ПЭТ-сканирование и анализ плазмы на А β и фосфорилированный тау [11, 12], которые в настоящее время используются и могут быть связаны с дефектной аутофагией и митофагией, оцениваемых для клинических нужд и исследовательских целей.

В настоящее время доминирующей гипотезой патогенеза БА остается так называемая гипотеза амилоидного каскада, приводящего к накоплению А β в структурах мозга [7]. Чрезмерное накопление и агрегация А β при БА запускает цепь патологических процессов, приводящих к нейродегенерации и когнитивным нарушениям. Основным компонентом амилоидных агрегатов являются фрагменты А β из 38–43 аминокислотных остатков, получаемых из белка-предшественника амилоида (APP) путем протеолитического процесса. Основное токсическое действие приписывается олигомерам А β , а не фибриллярному А $\beta 42$ в амилоидных бляшках, оно проявляется на самых ранних стадиях БА и, вероятно, инициирует патологический каскад. Было высказано предположение, что дисбаланс между работой и удалением А β способствует аномальному накоплению А β , и эти механизмы усугубляются по мере старения и развития заболевания [3, 8–12].

Ранее было выявлено несколько возможных биомаркеров развития БА, среди которых найден измененный липидный профиль сыворотки крови (оценка общего холестерина и холестерина ли-

попротеинов низкой плотности (ЛПНП); антиатерогенный липопротеин высокой плотности (ЛПВП), триглицериды (ТГ)) [13, 14]. В целом, было высказано суждение о дислипидемии как об известном факторе риска когнитивных нарушений [15]. Была показана положительная корреляция ЛПВП с аксиальной диффузией во многих отделах, связанных с микроструктурой белого вещества мозга. Эта связь не зависела от генотипа аполипопротеина Е (АРОЕ), артериального давления или приема статинов. ЛПНП ослабляли связь между легкой цепью нейрофиламента (NfL) и AxD в основе мозолистого тела ($p = 0.041$), правой поясной извилины ($p = 0.041$), правого fornix/stria terminalis ($p = 0.025$) и правого верхнего продольного пучка ($p = 0.020$), а ТГ – в правом нижнем продольном пучке ($p = 0.004$) и левом fornix/stria terminalis ($p = 0.001$) [14]. Возможно, изменения липидов в плазме крови связаны с микроструктурными изменениями белого вещества и аксональной дегенерацией и могут представлять собой фактор риска при переходе от обычного старения к болезни. Согласно [16], изменения липидного профиля могут быть связаны с этиологией и прогрессированием БА, а также показана связь между низким уровнем холестерина и ЛПНП-С в сыворотке крови и когнитивным снижением у пациентов с БА.

Биомаркеры жидкостей организма и ПЭТ при БА могут хорошо отражать синаптическую недостаточность [17]. Биомаркеры на основе крови представляют собой значительную альтернативу алгоритму скрининга БА на основе первичной медицинской помощи, учитывая высокую распространенность заболевания. Комбинированный подход к биомаркерам сыворотки и плазмы крови полезен для преодоления многочисленных проблем, связанных с анализом данных по гетерогенности БА.

БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА

БП – второе по распространенности нейродегенеративное заболевание, поражающее множество людей во всем мире и резко увеличивающееся с возрастом [18, 19]. БП вызывается аномальным накоплением α -синуклеина в дофаминергических нейронах substantia nigra, что позднее вызывает моторные симптомы [20–22]. БП является распространенным нейродегенеративным заболеванием, при котором образование неправильно свернутого и агрегированного α -синуклеина является ключевым нейропатологическим отличием [20]. Нейровоспаление также играет важную роль в патогенезе БП [23–25]. Нейровоспаление включает в себя активацию микроглии, повышение уровня провоспалительных факторов и нарушение микробиоты кишечника [26]. Согласно последним данным, для выявления БП использу-

ются такие биомаркеры воспаления как интерлейкины IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, фактор некроза опухоли (TNF- α); в ходе активации нормальные Т-клетки экспрессируют хемокин RANTES (Regulated upon Activation, Normal T Cell Expressed and Presumably Secreted) и предположительно секретируют высокочувствительный С-реактивный белок (hsCRP); соответственно, радиомаркеры, такие как [¹¹C]PK11195 и [¹⁸F]-FERRA, применяются для мониторинга прогрессирования заболевания и реагирования на лечение [24].

Однако роль нейровоспаления и активации микроглии при БП, особенно на ранних стадиях заболевания и прогрессирования, до сих пор остается дискуссионной [25, 26]. На ранней стадии формирования БП возникновение выраженного нейровоспалительного процесса не всегда подтверждается (что может быть полезным для диагностики заболевания и лечения). В конечной стадии заболевания посмертный анализ мозга больных БП показал, что нейровоспаление и микроглиоз являются ключевыми характеристиками патологического процесса.

В эксперименте на 18-месячных мышях с дефицитом NF- κ B/c-Rel (c-rel^{-/-} мыши), модели паркинсоноподобной патологии, Poggini et al. (2017) [27] исследовали, как воспаление и активация микроглии выражены в начале и прогрессировании паркинсоноподобной патологии. Авторы исследовали экспрессию цитокинов интерлейкина-1 β (IL-1 β), интерлейкина-6 (IL-6) и маркеров активации микроглии/макрофагов Fc gamma рецептор III (Fcgr3), маннозу, экспрессированную на миелоидных клетках 2 (Trem2), рецептор 1 (Mrc1), хитиназа-подобный белок 3 (Yml), аргиназу 1 (Arg 1), триггерный рецептор вместе с микроглиальной связывающей ионы кальция адаптерной молекулой 1 (Iba-1) и иммунолабильность глиального фибриллярного кислого белка астроцитов (GFAP) в substantia nigra (SN) мышей c-rel^{-/-} в премоторной (4- и 13-месячный возраст) и моторной фазах (18-месячный возраст) процесса. Авторы обнаружили повышенную экспрессию маркеров микроглии/макрофагов M2c (Mrc1 и Arg1) у 4-месячных мышей c-rel^{-/-}. Транскрипция маркеров M2c снижалась у 13-месячных мышей c-rel^{-/-}. В этом возрасте провоспалительный IL-1 β , но не IL-6 или маркер M1-поляризации микроглии-макрофагов Fcgr3/CD16, повышался по сравнению с диким типом. Однако признаков астроглиоза в substantia nigra у разных групп животных обнаружено не было. В итоге, данное исследование подтверждает наличие легкого воспалительного процесса без явных признаков глиоза у мышей c-rel^{-/-} в возрасте до 18 мес. Это позволяет предположить, что симптомы фенотипа, подобного БП, могут развиваться в отсутствие сопутствующего тяжелого воспалительного процесса.

Патогенез БП до сих пор не ясен. Предполагается, что он связан с определенными механизмами, такими как воспаление [26], окислительный стресс [25] дисфункция митохондрий, аномальная агрегация белков и чрезмерная активация NMDA (N-метил-D-аспартат) рецепторов [28, 29]. Показано, что уровень цистатина С (Cst3) и гомоцистеина (НСУ) в сыворотке крови больных БП выше, чем в сыворотке крови в контрольной группе [30, 31]. Поэтому Cst3 в сыворотке крови является перспективным биомаркером для диагностики болезни Паркинсона [30].

Обнаружено, что оба соединения – Cst3 и НСУ – в сыворотке крови участвуют в воспалительной реакции. Уровни экспрессии Cst3 и НСУ были выше у пациентов с легкой когнитивной недостаточностью, и оба маркера показали поразительную положительную корреляцию с ней [32]. Cst3 в мозге был обнаружен в хориоидном сплетении, мягких менингеальных клетках, клетках астроглии, нейрональных прогениторных клетках и зрелых нейронах [33]. Высокие физиологические концентрации Cst3 в спинномозговой жидкости и его эффект в стимулировании пролиферации нейрональных стволовых клеток убедительно показывают, что Cst3 обладает эффектом поддержки питания клеток мозга.

Предпринимаются новые попытки диагностировать развитие БП и предложить новые биологические маркеры заболевания [34]. Среди нейроспецифических маркеров, указывающих на повышенный уровень периферических белков нейродегенерации и воспаления, было предложено несколько соединений, таких как фактор роста фибробластов 21 и ингибитор пептидазы 3. Несколько маркеров, включая IL-6 (связанный с воспалением) и цистатин В (ингибитор цистеиновой протеазы катепсина L), коррелировали с ухудшением когнитивности и прогрессированием двигательных симптомов в начальном периоде БП. Эти результаты были независимо подтверждены в рамках проекта “Parkinson Progression Marker Initiative”.

Кроме того, легкая цепь нейрофиламента NfL – белка, специфичного для аксонального повреждения – недавно была признана перспективным биомаркером многочисленных нейродегенеративных заболеваний [35, 36]. Исследования использовали и фокусировали внимание на NfL в диагностических и прогностических целях и расширили возможности этого биомаркера за рамки нейродегенеративных заболеваний [35–37]. NfL может быть аналогом и подобным хорошо известному С-реактивному белку [37–39]. Более того, NfL как β -синуклеин спинномозговой жидкости был предложен в качестве синаптического биомаркера доклинической стадии БА [39, 40].

ПОИСК НОВЫХ БИОМАРКЕРОВ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ. ЭКЗОСОМЫ И ЦИСТАТИН С

Поиск новых биомаркеров при нейродегенеративных заболеваниях связан с изучением протеаз/ингибиторов протеаз, анализом протеома [34, 41]. В последнее время изучение протеолиза в клетках мозга было сосредоточено на аутофагосомах и эндосомах, транспортирующих белки из области синаптических контактов в сому для их деградации, что является важным моментом; следующей целью является изучение внеклеточных везикул, которые критически важны для межклеточной коммуникации, особенно их разнообразное содержимое, включая белки [42].

К настоящему времени в предшествующих исследованиях сообщалось о повышенных плазматических уровнях эндогенного ингибитора цистеиновых протеаз Cst3 при БП и утверждалось о его возможной связи с тяжестью и прогрессированием заболевания. Позже было обнаружено, что уровень Cst3 был выше при БП по сравнению с контролем, что коррелировало с таковым для легкой цепи нейрофиламента NfL ($r = 0.204$, $p = 0.046$) в плазме крови [43, 44]. При долгосрочном анализе у пациентов с БП с более высоким уровнем Cst3 наблюдалось более быстрое прогрессирование моторной активности в течение 2 лет наблюдения независимо от профиля периферического воспаления. Связь Cst3 с тяжестью заболевания оценивали с учетом влияния возраста, пола, длительности заболевания и периферического воспаления [43]. Полученные результаты являются перспективными, и необходимы дальнейшие исследования в этом направлении.

При других нейродегенеративных заболеваниях – БА, деменции с тельцами Леви и лобно-височной деменции, которые представляют собой три основных нейродегенеративных деменции, характеризующихся высоким аномальным белковым накоплением в мозге, обнаружили более высокую концентрацию экстравезикулярного материала в спинномозговой жидкости и более мелкие его размеры у пациентов с БА и деменцией с тельцами Леви по сравнению с контрольной группой. Классификационный анализ показал, что экстравезикулярный размер является лучшим параметром, способным отличить пациентов от контрольной группы (96.7% против 3.3% соответственно) [45]. Результаты исследования свидетельствуют об общем участии эндосомного пути в процессах нейродегенеративных деменций, что позволяет по-новому взглянуть на молекулярные механизмы, лежащие в основе этих патологий.

Cst3 в настоящее время рассматривается как один из факторов, ассоциированных с экзосомами [46–48]. Было высказано предположение, что

продукция экзосом является ключом к целостности эндосомального пути нейронов при нейродегенеративных заболеваниях [46]. Более того, экзосомы, перегруженные Cst3, показали положительные эффекты при некоторых патологических состояниях, таких как метаболический синдром, атеросклероз [40]. Cst3 высвобождается в ассоциации с экзосомами и является действительно новым инструментом нейронной коммуникации, которая при БА не сбалансирована [47, 49]. Дисфункция эндосомально-лизосомной системы является важным патогенетическим фактором БА и других нарушений нервной системы [46].

Согласно недавним взглядам, внеклеточные везикулы (EVs, экзосомы) стали новой концепцией в области биомаркеров. Служа транспортными средствами для молекул между клетками, они представляют собой перспективный источник биомаркеров ряда заболеваний, включая нейродегенеративные нарушения [50–52], играя важную роль при БА [53, 54] и БП [55].

Экзосомы, полученные из глиальных клеток (астроцитов, микроглии и олигодендроцитов), могут модулировать клеточную коммуникацию в головном мозге и оказывать защитное или нейротоксическое действие на нейроны в зависимости от микроокружения при их высвобождении [56]. Экзосомы микроглии могут способствовать передаче α -синуклеина при болезни Паркинсона [57], увеличивая нейротоксичность. Таким образом, микроглиальные экзосомы могут способствовать прогрессированию α -синуклеиновой патологии и, следовательно, могут служить перспективной терапевтической мишенью при БП [22, 57].

АГРЕГАЦИЯ Cst3 В РАЗВИТИИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ – НОВЫЙ БИОМАРКЕР ПРИ БА И БП?

Cst3 принадлежит к семейству цистатинов [58, 59], контролирующей активность цистеиновых протеаз. Cst3 вовлечен в церебральную амилоидную ангиопатию (ЦАА), где Cst3 был обнаружен в агрегированном виде [60]. В экспериментах Cst3, как было показано ранее, ингибирует отложение бета-амилоида на моделях мышей с болезнью Альцгеймера [61]. Анализ активности катепсина В показал, что агрегированный Cst3 менее эффективно ингибирует активность фермента при pH 5.5. При pH 7.4 Cst3 почти полностью утрачивал ингибирующие свойства. Кроме того, агрегированный Cst3 не ингибировал образование фибрилл $A\beta$ 1-40, а, наоборот, немного увеличивал его.

Экспрессия Cst3 в мозге высока [62]. Кроме того, его концентрация в спинномозговой жидкости примерно в пять раз выше, чем в плазме крови [63]. Такие данные указывают на его важную роль в гомеостазе мозга. При нейровоспале-

нии микроглия выделяет цистеиновые протеазы во внеклеточное пространство [64]. В этой ситуации Cst3 может ингибировать активность таких цистеиновых протеаз и тем самым регулировать течение нейровоспаления. На самом деле, баланс между протеазами и ингибиторами протеаз важен для контроля скорости клеточного метаболизма и барьерной функции органов [65–67]. Следовательно, нарушение такого ингибирующего действия Cst3 может привести к изменению нейровоспаления, ведущего к нейродегенерации.

Cst3, кодируемый геном *CST3*, экспрессируется во всех типах клеток [68]. Он состоит из 120 аминокислот, а его молекулярная масса равна 13 КДа [68], он локализован в лизосомах [69, 70], где он играет важную роль в контроле их функций путем регулирования активности ферментов цистеиновых протеаз, включая катепсины В, Н и L [71, 72]. Он также локализуется в эндоплазматическом ретикулуме и комплексе Гольджи, что указывает на то, что он является секретлируемым белком [68, 73]. Считается, что во внеклеточном пространстве он нейтрализует активность протеаз, которые часто высвобождаются или просачиваются из лизосом гибнущих или поврежденных клеток [74, 75]. Экспрессия Cst3 в головном мозге высока [62]. Кроме того, его концентрация в спинномозговой жидкости примерно в пять раз выше, чем в плазме крови [63]. Такие данные указывают на его важную роль в гомеостазе мозга. При нейровоспалительных заболеваниях микроглия выделяет цистеиновые протеазы во внеклеточное пространство [64]. Здесь, во внеклеточном пространстве, Cst3 может ингибировать активность таких цистеиновых протеаз, как катепсины В и L.

Согласно сообщению [76], появляется все больше научных данных, отмечающих сходство между нейронами глаза и другими структурами центральной нервной системы (ЦНС), что позволяет предположить, что знания, полученные в ходе исследований глаза, могут быть полезны для изучения и диагностики БА. Сетчатка и зрительный нерв считаются частью центральной нервной системы, и их повреждение может привести к ретроградной и антероградной дегенерации аксонов, а также к аномальной агрегации белков. В переднем сегменте глаза жидкий секрет и слезная жидкость могут быть сравнимы со спинномозговой жидкостью. Обе жидкости обогащены молекулами, которые могут быть потенциальными биомаркерами нейродегенеративных заболеваний.

Согласно результатам, полученным в нашей лаборатории, у здоровых лиц концентрация Cst3 во всех полученных биологических жидкостях глаза не зависела от пола. Концентрация Cst3 в биологических жидкостях здоровых людей снижалась в следующем порядке: цереброспиналь-

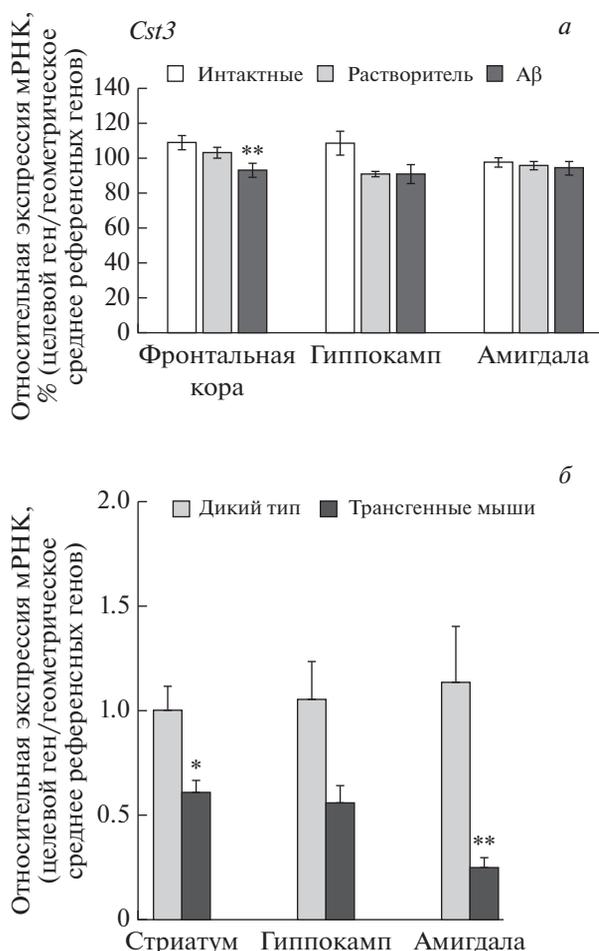


Рис. 1. Экспрессия мРНК гена *Cst3*, кодирующего цистатин С, в мозге мышей в моделях БА (а) и БП (б). Данные представлены как среднее ± ошибка среднего, $n = 6-8$ на группу. Уровни мРНК оценивали с помощью метода RT-PCR, подробно описанного ранее [77]. а: Для создания нейротоксической модели БА мышам C57BL/6J вводили олигомеры фрагмента амилоида- β (A β 25–35) (Sigma) билатерально в мозговые желудочки, как описано ранее [77]. Обозначения: ** $p < 0.01$ по сравнению с интактными мышами. б: Трансгенные 5-месячные мыши B6. Cg-Tg(Prrp-SNCA*A53T)23Mkle/J с оверэкспрессией α -синуклина были использованы в качестве модели БП [78]. Обозначения: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с мышами контрольной линии дикого генотипа.

ная жидкость > сыворотка крови > глазная жидкость (слезы) [66]. Концентрация Cst3 в слезной жидкости пациентов с опухолью, увеальной меланомой (как для глаза со злокачественной опухолью, так и для контралатерального, непораженного глаза), была значительно выше, чем концентрация Cst3 в слезной жидкости здоровых людей, и не зависела от размера опухоли [66]. В результате Cst3 (как и другой ингибитор цистеиновых протеаз цистатин SN) был предложен в качестве возможного биомаркера некоторых опухолей (в частности, увеальной меланомы).

Согласно нашим результатам по экспрессии Cst3, полученным на экспериментальных моделях нейродегенерации (модели БА и БП), значительное снижение относительного уровня его мРНК было показано в стриатуме и миндалине с тенденцией к снижению в гиппокампе (рис. 1б). Эти изменения могут быть связаны с воспалением, развивающимся в этих зонах мозга мышей с моделью БП. В то же время незначительные изменения (также уменьшающиеся) были отмечены у мышей с моделируемой БА-подобной патологией (снижение в лобной коре, рис. 1а) без изменений в гиппокампе и миндалине. Сравнивая две изученные модели, можно сделать вывод о более выраженных изменениях экспрессии Cst3 в паркинсоноподобной модели нейродегенерации, представляющей в данном случае недостаточность Cst3.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Плазма крови и спинномозговая жидкость являются основными биологическими жидкостями, доступными для поиска биологических маркеров нейродегенеративных заболеваний — БА и БП. Мы попытались представить некоторые новые результаты по биомаркерам этих нейродегенеративных заболеваний, в основном в биологических жидкостях. Новые биомаркеры при БА включают анализ плазмы на Аβ и фосфорилированный тау, а также ПЭТ (позитронно-эмиссионную томографию), которые демонстрируют большие перспективы для клинического и исследовательского использования. В ходе изучения БП сывороточные цистатин С и гомоцистеин рассматривались как новые перспективные воспалительные биомаркеры для диагностики. Согласно последним данным, исследование внеклеточных везикул (экзосом) рассматривается как новая перспективная концепция в области биомаркеров нейродегенерации. Для подтверждения этих выводов в будущем необходимы дополнительные исследования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование было поддержано бюджетным финансированием фундаментальных научных исследований Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины” (тема № 122042700001-9 (2021–2025)).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Strimbu K., Tavel J.A.* // *Curr. Opin. HIV AIDS*. 2010. V.5. № 6. P. 463–466.
2. *Teunissen C.E., Verberk I.M.W., Thijssen E.H., Vermunt L., Hansson O., Zetterberg H., van der Flier W.M., Mielke M.M., Del Campo M.* // *Lancet Neurol*. 2022. V. 21. № 1. P. 66–77.
3. *Scheltens P., De Strooper B., Kivipelto M., Holstege H., Chételat G., Teunissen C.E., Cummings J., van der Flier W.M.* // *Lancet*. 2021. V. 397(10284). P.1577–1590.
4. *Hansson O.* // *Nat. Med*. 2021. V.27. № 6. P. 954–963.
5. *Tatulian S.A.* // *Drug Discov. Today*. 2022. V. 27. № 4. P. 1027–1043.
6. *McGrowder D.A., Miller F., Vaz K., Nwokocha C., Wilson-Clarke C., Anderson-Cross M., Brown J., Anderson-Jackson L., Williams L., Latore L., Thompson R., Alexander-Lindo R.* // *Brain Sci*. 2021. V. 11. № 2. P. 215.
7. *Doroszkiewicz J., Groblewska M., Mroczko B.* // *Int. J. Mol. Sci*. 2022. V. 23. № 9. P. 4610.
8. *Ma C., Hong F., Yang S.* // *Molecules*. 2022. V. 27. № 4. P. 1210.
9. *Frisoni G.B., Altomare D., Thal D.R., Ribaldi F., van der Kant R., Ossenkoppele P.R., Blennow K., Cummings J., van Duijn C., Nilsson P.M., Dietrich Y., Scheltens P., Dubois B.* // *Nat. Rev. Neurosci*. 2022. V. 23. № 1. P. 53–66.
10. *Serrano-Pozo A., Das S., Hyman B.T.* // *Lancet Neurol*. 2021. V. 20. № 1. P. 68–80.
11. *Tiwari S., Atluri V., Kaushik A., Yndart A., Nair M.* // *Int. J. Nanomedicine*. 2019. V. 14. P. 5541–5554.
12. *Reddy P.H., Oliver D.M.* // *Cells*. 2019. V. 8. № 5. P. 488.
13. *Lepara O., Valjevac A., Alajbegović A., Začiragić A., Nakas-İçindić E.* // *Bosn. Basic Med. Sci*. 2009. V. 9. № 3. P. 215–220.
14. *Iriondo A., García-Sebastian M., Arrospide A., Arriba M., Aurtente S., Barandiaran M., Clerigue M., Ecay-Torres M., Estanga A., Gabilondo A., Izagirre A., Saldias J., Tainta M., Villanua J., Mar J., Goñi F.M., Martínez-Lage P.* // *Brain Imaging Behav*. 2021. V. 15. № 2. P. 1043–1057.
15. *Zhuo X., Huang M., Wu M.* // *Medicine (Baltimore)*. 2022. V. 101. P. 10.e28934.
16. *Presečki P., Mück-Seler D., Mimica N., Pivac N., Mustapić M., Stipcević T., Smalc V.F.* // *Coll. Antropol*. 2011. V. 35. Suppl 1. P. 115–120.
17. *Zhang F., Petersen M., Johnson L., Hall J., O'Bryant S.E.* // *Genes (Basel)*. 2022. V. 13. № 10. P. 1738.
18. *Kwon E.H., Tennagels S., Gold R., Gerwert K., Beyer L., Tönges L.* *Biomolecules*. 2022. V. 12. № 2. P. 329.
19. *Karayel O., Virreira Winter S., Padmanabhan S., Kuras Y.I., Vu D.T., Tuncali I., Merchant K., Wills A.M., Scherzer C.R., Mann M.* // *Cell Rep. Med*. 2022. V. 3. № 6. P. 100661.
20. *Pinnelli J.R., Cui M., Tieu K.* // *J. Neurochem*. 2021. V. 157. P. 413–428.
21. *Stefanova N.* // *J. Parkinsons Dis*. 2022. V. 12. P. S105–S112.
22. *Picca A., Guerra F., Calvani R., Romano R., Coelho-Junior H.J., Bucci C., Marzetti E.* // *Biomolecules*. 2021. V. 11. № 10. P. 1508.

23. Liu T.W., Chen C.M., Chang K.H. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 8. P. 4148.
24. Liu S.Y., Qiao H.W., Song T.B., Liu X.L., Yao Y.X., Zhao C.S., Barret O., Xu S.L., Cai Y.N., Tamagnan G.D., Sossi V., Lu J., Chan P. // *J. Neuroinflammation.* 2022. V. 19. № 1. P. 209.
25. Tansey M.G., Wallings R.L., Houser M.C., Herrick M.K., Keating C.E., Joers V. // *Nat. Rev. Immunol.* 2022. V. 22. № 11. P. 657–673.
26. Weintraub D., Aarsland D., Chaudhuri K.R., Dobkin R.D., Leentjens A.F., Rodriguez-Violante M., Schrag A. // *Lancet Neurol.* 2022. V. 21. № 1. P. 89–102.
27. Porrini V., Mota M., Parrella E., Bellucci A., Benarese M., Faggi L., Tonin P., Spano P.F., Pizzi M. // *Front. Aging Neurosci.* 2017. V. 9. № 8. P. 229.
28. Italia M., Ferrari E., Diluca M., Gardoni F. // *Biomedicines.* 2022. V. 10. № 7. P. 1550.
29. Mollenhauer B., von Arnim C.A.F. // *Science.* 2022. V. 377. № 6608. P. 818–819.
30. Yang C.G., Cai S.M., Liu C.Y., Chen C. // *J. Integr. Neurosci.* 2021. V. 20. № 2. P. 349–357.
31. Hildebrand F., Rosario D., Bidkhorji G., Lee S., Bedarf J., Le Chatelier E., Uhlen M., Ehrlich S.D., Proctor G., Wüllner U., Mardinoglu A., Shoaie S. // *Cell Rep.* 2021. V. 34. № 9. P. 108807.
32. Hu W.D., Chen J., Mao C.J., Feng P., Yang Y.P., Luo W.F., Liu C.F. // *Cogn. Behav. Neurol.* 2016. V. 29. № 3. P. 144.
33. Zou K., Abdullah M., Michikawa M. // *J. Pers. Med.* 2020. V. 10. № 3. P. 85.
34. Bartl M., Dakna M., Schade S., Otte B., Wicke T., Lang E., Starke M., Ebentheuer J., Weber S., Toischer K., Schnelle M., Sixel-Döring F., Trenkwalder C., Mollenhauer B. // *Mov. Disord.* 2023. V. 38. № 1. P. 68–81.
35. Gaetani L., Blennow K., Calabresi P., Di Filippo M., Parnetti L., Zetterberg H. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2019. V. 90. № 8. P. 70–881.
36. Gaetani L., Höglund K., Parnetti L., Pujol-Calderon F., Becker B., Eusebi P., Sarchielli P., Calabresi P., Di Filippo M., Zetterberg H., Blennow K. // *Alzheimers Res. Ther.* 2018. V. 10. № 1. P. 8.
37. Gaetani L., Parnetti L. // *Neurology.* 2022. V. 98. № 22. P. 911–912.
38. Parnetti L., Paolini Paoletti F., Gaetani L. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2022. V. 93. № 6. P. 571.
39. Barba L., Abu Rumeileh S., Bellomo G., Paolini Paoletti F., Halbgebauer S., Oeckl P., Steinacker P., Massa F., Gaetani L., Parnetti L., Otto M. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2023. V. 94. № 1. P. 83–86.
40. Pérez-Macedonio C.P., Flores-Alfaro E., Alarcón-Romero L.D.C., Vences-Velázquez A., Castro-Alarcón N., Martínez-Martínez E., Ramirez M. // *Peer J.* 2022. V. 10. P. e13656.
41. Hegde A.N., Duke L.M., Timm L.E., Nobles H. // *Subcell. Biochem.* 2023. V. 102. P. 99–112.
42. Campbell D.S., Díaz-Hernández M., Alvarez-Castelão B. // *Front. Mol. Neurosci.* 2022. V. 15. P. 958507.
43. Imarisio A., Pilotto A., Garrafa E., Conforti F., Masciocchi S., Turrone R., Gipponi S., Cottini E., Rizzetti M.C., Porrini V., Gussago C., Pizzi M., Guadagni F., Zetterberg H., Ashton N.J., Hye A., Padovani A. // *Neurodegener. Dis.* 2021. V. 21. № 5–6. P. 109–116.
44. Ladang A., Kovacs S., Lengel L., Locquet M., Reginster J.Y., Bruyère O., Cavalier E. // *Aging Clin. Exp. Res.* 2022. V. 34. № 2. P. 331–339.
45. Longobardi A., Nicsanu R., Bellini S., Squitti R., Catania M., Tiraboschi P., Saraceno C., Ferrari C., Zanardini R., Binetti G., Di Fede G., Benussi L., Ghidoni R. // *Cells.* 2022. V. 11. № 3. P. 462.
46. Mathews P.M., Levy E. // *Front. Neurosci.* 2019. V. 13. P. 1347.
47. Ghidoni R., Paterlini A., Albertini V., Glionna M., Monti E., Schiaffonati L., Benussi L., Levy E., Binetti G. // *Neurobiol. Aging.* 2011. V. 32. № 8. P. 1435–1442.
48. Pérez-González R., Sahoo S., Gauthier S.A., Kim Y., Li M., Kumar A., Pawlik M., Benussi L., Ghidoni R., Levy E. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 11104.
49. Zhang W., Zhang J., Huang H. // *Exp. Cell Res.* 2022. V. 420. № 1. P. 113332.
50. Raposo G., Stoorvogel W. // *J. Cell. Biol.* 2013. V. 200. № 4. P. 373–383.
51. Hill A.F. // *J. Neurosci.* 2019. V. 39. № 47. P. 9269–9273.
52. Wang Y., Xia X. // *Front. Cell Neurosci.* 2022. V. 16. P. 1109885.
53. Xiao T., Zhang W., Jiao B., Pan C.Z., Liu X., Shen L. // *Transl. Neurodegener.* 2017. V. 6. P. 3.
54. Neumann M., Mackenzie I.R.A. // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2019. V. 45. № 1. P. 19–40.
55. Li K.L., Huang H.Y., Ren H., Yang X.L. // *Neural. Regen. Res.* 2022. V. 17. № 9. P. 1898–1906.
56. Oyarce K., Cepeda M.Y., Lagos R., Garrido C., Vega-Letter A.M., Garcia-Robles M., Luz-Crawford P., Elizondo-Vega R. // *Front. Cell Neurosci.* 2022. V. 16. P. 920686.
57. Guo M., Wang J., Zhao Y., Feng Y., Han S., Dong Q., Cui M., Tieu K. // *Brain.* 2020. V. 143. № 5. P. 1476–1497.
58. Turk V., Stoka V., Vasiljeva O., Renko M., Sun T., Turk B., Turk D. // *Bochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1824. № 1. P. 68–88.
59. Korolenko T.A., Pisareva E.E., Filyushina E.E., Johnston T.P., Machova E. // *Exp. Toxicol. Pathol.* 2015. V. 67. № 9. P. 459–466.
60. Sheikh A.M., Wada Y., Tabassum S., Inagaki S., Mitaki S., Yano S., Nagai A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 18. P. 9682.
61. Mi W., Pawlik M., Sastre M., Jung S.S., Radvinsky D.S., Klein A.M., Sommer J., Schmidt S.D., Nixon R.A., Mathews P.M. et al. // *Nat. Genet.* 2007. V. 39. № 12. P. 1440–1442.
62. Yasuhara O., Hanai K., Ohkubo I., Sasaki M., McGeer P.L., Kimura H. // *Brain Res.* 1993. V. 628. № 1–2. P. 85–92.
63. Ren Y., Zhu W., Cui F., Yang F., Chen Z., Ling L., Huang X. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015. V. 8. № 5. P. 5419–5426.
64. Vidak E., Javoršek U., Vizovišek M., Turk B. // *Cells.* 2019. V. 8. № 3. P. 264.
65. Korolenko T.A., Cherkanova M.S., Gashenko E.A., Johnston T. // *Cystatins, Protease Inhibitors, Biomarkers and Immunomodulators.* Cohen J.B., Ryseck L.P.,

- editors. New York, USA: Nova Science Publishers. 2011. p. 187–204.
66. *Dikovskaya M.A., Trunov A.N., Chernykh V.V., Korolenko T.A.* // *Int. J. Circumpolar Health*. 2013. V. 72 (Suppl 1). P. 21087.
 67. *Dikovskaya M.A., Russkikh G.S., Loktev K.V., Johnston T.P., Gevorgyan M.M., Voronina N.P., Chernykh V.V., Trunov A.N., Korolenko T.A.* // *Radiol. Oncol*. 2021. V. 56. № 1. P. 83–91.
 68. *Mussap M., Plebani M.* // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci*. 2004. V. 41. № 5–6. P. 467–550.
 69. *Yamazaki T.S., Atsuta I., Danjo A. Mino., Kagia T., Nishijima K., Jang J., Kido M.A., Tanaka T.* // *Acta Histochem. Cytochem*. 2005. V. 38. № 2. P. 121–129.
 70. *Deng A., Irizarry M.C., Nitsch R.M., Growdon J. H., Rebeck G.W.* // *Am. J. Pathol*. 2001. V. 159. № 3. P. 1061–1068.
 71. *Watanabe S., Hayakawa T., Wakasugi K., Yamanaka K.* // *Cell Death Dis*. 2014. V. 5. № 10. P. e1497.
 72. *Abrahamson M., Barrett A., Salvesen G., Grubb A.* // *J. Biol. Chem*. 1986. V. 261. № 24. P. 11282–11289.
 73. *Zavasnik-Bergant T., Bergant M., Jaras M., Griffiths G.* // *Radiol. Oncol*. 2006. V. 40. P. 183–188.
 74. *Lutgens S.P.M., Cleutjens K.B.J.M., Daemen M., Heeneman S.* // *FASEB J*. 2007. V. 21. P. 3029–3041.
 75. *Turk V., Stoka V., Turk D.* // *Front. Biosci*. 2008. V. 13. P. 5406–5420.
 76. *Romaus-Sanjurjo D., Regueiro U., López-López M., Vázquez-Vázquez L., Ouro A., Lema I., Sobrino T.* // *Int. J. Mol. Sci*. 2022. V. 23. № 5. P. 2486.
 77. *Pupyshev A.B., Belichenko V., Tendinik M.V., Bashirzade A.A., Dubrovina N.I., Ovsyukova M.V., Akopyan A.A., Fedoseeva L.A., Korolenko T.A., Amstislavskaya T.G., Tikhonova M.A.* // *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2022. V. 217. P. 173406.
 78. *Pupyshev A.B., Korolenko T.A., Akopyan A.A., Amstislavskaya T.G., Tikhonova M.A.* // *Neurosci. Lett*. 2018. V. 672. P. 140–144.

Some Advanced Biomarkers of Neurodegenerative Disorders: Focus on Cystatin C

T. A. Korolenko^a, A. B. Pupyshev^a, V. M. Belichenko^a, M. A. Tikhonova^a, and T. G. Amstislavskaya^{a, b}

^a*Scientific_Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia*

^b*Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia*

The search for biological markers of neurodegenerative diseases, namely, Alzheimer's (AD) and Parkinson's (PD) diseases, is actual problem for fundamental biology and modern medicine. The aim of this review was to present some new results on biomarkers of these neurodegenerative disorders, mainly in biological fluids, like plasma and cerebrospinal fluid. Novel biomarkers in AD include plasma assays for amyloid- β and phosphorylated tau and PET (positron emission tomography) scans, which show great promise for clinical and research use. In PD research, serum cystatin C (Cst3) and homocystein in PD patients were higher than in serum of the normal control group and they were considered as new inflammatory biomarkers. Cst3 in biological fluids was suggested as a promising biomarker for diagnosing PD. Recently, extracellular vesicles (exosomes) have been reported as a new concept in the biomarker field. Serving as transfer vehicles between cells, they represent a promising source of biomarkers for a number of diseases, including neurodegenerative disorders. To date, developmental mechanisms and approaches to the treatment of neurodegenerative diseases (AD, PD) seemingly are extremely relevant, requiring common solutions and the development of new approaches.

Keywords: neurodegeneration, biomarkers, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, cystatin C, exosomes

УДК 577.25;616.8

МНОЖЕСТВЕННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ТРЕГАЛОЗЫ В ТОРМОЖЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

© 2023 г. А. Б. Пупышев¹*, Т. А. Короленко¹, М. А. Тихонова¹

¹ФГБНУ “Научно-исследовательский институт нейронаук и медицины”,
Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 28.02.2023 г.

После доработки 28.03.2023 г.

Принята к публикации 20.04.2023 г.

Поиск средств лечения нейродегенерации связывается с атакой на множественные механизмы формирования этой патологии. Подобные свойства обнаружены у дисахарида трегалозы, проявляющего терапевтический эффект на моделях многих заболеваний и получившей поддержку FDA для применения на людях. Трегалоза состоит из 2 остатков глюкозы, соединенных гибкой α -1-1'-гликозидной связью, обеспечивающей ей шапероноподобные свойства. Благодаря этому она препятствует аномальному свертыванию aberrantных белков и обладает свойствами крио- и биопротектора. Однако основное терапевтическое действие определяется индукцией mTOR-независимой аутофагии, опосредуемой киназой AMPK в качестве основной мишени. Результатом является ослабление накопления цитотоксических белков и факторов, повышение клеточной жизнеспособности. Увеличение эффективности аутофагии зависит от вызываемой трегалозой индукции биогенеза лизосом и аутофагосом посредством активации транскрипционных факторов TFEB и FOXO1. Трегалоза оказывает противовоспалительное действие, тесно связанное с торможением окислительного стресса. Найдено индуцируемое трегалозой усиление эндогенной антиоксидантной защиты, зависимой от регулятора Nrf2. В обзоре рассматривается нейропротективное действие трегалозы на моделях основных нейродегенеративных заболеваний, таких как болезни Паркинсона, Альцгеймера, Хантингтона и других. В целом, трегалоза показывает высокий терапевтический потенциал в лечении экспериментальной нейродегенерации и тем самым стимулирует изучение возможностей ее клинического применения.

Ключевые слова: нейродегенерация, нейропротекция, α -синуклеин, амилоид- β , тау, трегалоза, аутофагия, mTOR-независимая, AMPK, TFEB, Nrf2, GLUT8, нейровоспаление, окислительный стресс, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера, болезнь Хантингтона, боковой амиотрофический склероз, окулофарингеальная мышечная дистрофия

DOI: 10.31857/S1027813323040192, EDN: OVYUKU

Проблема нейродегенерации, распространенность таких заболеваний как болезнь Альцгеймера (БА), деменция с тельцами Леви, болезнь Паркинсона (БП) и других, далека от разрешения. Лечение нейродегенерации остро нуждается в разработке новых лекарственных средств и прежде всего средств патогенетически обоснованного лечения и мультитаргетных лекарственных препаратов, действующих на патогенетически важные мишени заболеваний [1, 2]. К ключевым процессам нейродегенерации относят накопление цитотоксичных склонных к агрегации пептидов и формирование их агрегатов, таких как амилоидные бляшки и нейрофибрилярные клубки тау-

протеина при БА, отложения α -синуклеина в тельцах Леви при БП и других синуклеинопатиях, агрегаты хантингтина при болезни Хантингтона (БХ) и т.д. [3]. Другим механизмом нейродегенерации является формирование окислительного стресса, связанного с накоплением поврежденных митохондрий и сопровождающегося наработкой АФК [4]. Под действием клеточной интоксикации возникает нейровоспаление, активация клеток микроглии и наработка провоспалительных цитокинов, что усугубляет прогрессирование нейродегенерации [5]. Важной компонентой нейродегенерации и старения является недостаточность аутофагии, являющейся собственным клеточным инструментом контроля качества белка, в том числе органелл [6]. В связи с этим идет направленный поиск средств комплексного воз-

* Адресат для корреспонденции: 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 4, e-mail: pupyshevab@neuronm.ru.

действия на множественные механизмы нейродегенерации.

В отношении экспериментальной нейродегенерации начиная с 2004 г. был показан нейропротективный эффект дисахарида трегалозы, которая оказалась полезной в коррекции нарушений на модели БХ у мышей [7]. Трегалоза тормозила агрегацию поли-глутаминовых белков в мозге мышей, снижала моторную недостаточность, продлевала жизнь мышам. Позднее нашли ее способность активировать аутофагию по mTOR-независимому пути и оказывать нейропротективное действие на клеточных моделях БП и БХ [8]. При системном введении трегалозы индукция аутофагии может происходить в различных органах одновременно [9], и таким образом, терапевтическое действие активации аутофагии затрагивает большое разнообразие клеток, тканей и органов, способствуя их устойчивости к неблагоприятным воздействиям. Активно исследовались терапевтические возможности трегалозы на моделях различных заболеваний и, особенно, при поражении мозга [10, 11]. Показано благотворное действие трегалозы на моделях таких заболеваний, как диабет, стеатоз печени, инфекции, нейродегенеративные заболевания и т.д. [11–13]. Широкое терапевтическое действие трегалозы связывается с вовлечением множественных цитопротективных механизмов [14] и крайне низкой токсичностью препарата [15], что облегчает ее терапевтическое применение. В настоящее время трегалоза проходит клинические испытания в лечении различной патологии, включая нейродегенеративные заболевания (<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=trehalose&term=&cntry=&state=&city=&dist=>). Судя по обилию публикаций по трегалозе, она привлекает возрастающий интерес исследователей возможностью коррекции экспериментальной нейродегенерации и транслационного перехода к клиническим испытаниям.

БИОХИМИЧЕСКИЕ И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРЕГАЛОЗЫ

Трегалоза образуется двумя остатками D-глюкозы, соединенных α -1-1'-гликозидной связью (O- α -D-glucopyranosyl-[1 \rightarrow 1']- α -D-glucopyranoside). Она является невосстанавливающим углеводом, имеющим высокую гидрофильность и высокую устойчивость к кислой среде. Трегалоза обладает способностью к пространственному взаимодействию с полярными группами биомолекул, что придает ей белок-протективные свойства. Она препятствует денатурации белков при высушивании, защищает клетки от термальной денатурации и агрегации, является природным криопротектором [16] и биопротектором, обеспечивающим беспозвоночным защиту от колебаний условий внешней среды [17].

Считается, что трегалоза не нарабатывается в организмах позвоночных, поскольку у них не обнаружено генов синтеза этого дисахарида. Однако она найдена в клетках кишечника, печени, почек и в мозге млекопитающих (в частности, в гиппокампе и коре мозга), что связывается с потреблением грибов и растительной пищи, содержащей трегалозу [18].

В кишечнике трегалоза подвергается расщеплению ферментом трегалазой (ген *TREH*), которая способна расщеплять субстрат почти полностью. Возможно, трегалаза есть и в телах нейронов [18]. Минорная часть дисахарида (менее 1%) может всасываться из кишечника в кровь в негидролизованном виде [19, 20] и распределяться по органам, не достигая там высоких концентраций. В частности, содержание трегалозы в мозге составляет не более 1% от ее содержания в плазме крови [21]. Впрочем, некоторые авторы допускают возможность всасывания в кровь до 20% поглощенной трегалозы [22].

Нейропротективные эффекты на клетках вызываются высокими концентрациями трегалозы, достигающими 100 мМ [8]. Такая концентрация трегалозы в мозге не может быть достигнута при модельном скармливании лабораторным животным *in vivo* (обычно 2% раствор, потребление около 6 мл/день). По этой причине для повышения концентрации трегалозы в крови в последнее время прибегают к внутривенному введению препарата, в обход кишечной трегалазы [23, 24].

Фармакодинамика трегалозы при пероральном применении является предметом дискуссий относительно возможных механизмов действия трегалозы на мозг [14]. Предполагается, что действие трегалозы на мозг может быть опосредованное, связанное с сигнализацией по пути микробиота–кишечник–мозг [25]. Показано, что трегалоза способна влиять на кишечную микробиоту, оказывая позитивное действие на “полезные” кишечные микробы, повышая их выживание, ослабляя экспериментальный колит, и/или подавляя опосредованную микробиотой секрецию провоспалительных цитокинов, вызывающих нейровоспаление [26]. Допускается возможность продукции энтероэндокринными клетками кишечника сигнальных молекул ряда нейротрансмиттеров (гамма-аминомасляной кислоты, 5-гидрокситриптамина и т.д.), секреции локальными дендритными клетками цитокинов, влияющих на работу мозга, возможность передачи сигналов в мозг посредством блуждающего нерва [25]. По некоторым данным, трегалоза оказывает регуляторное действие на уровне верхнего отдела тонкого кишечника [27].

Поиск путей непрямого влияния трегалозы на мозг остается крайне актуальным, поскольку помогает пониманию механизма действия препара-

та. Кроме того, это имеет трансляционную перспективу, так как у людей алиментарное применение трегалозы в целом предпочтительней, чем внутривенное введение.

МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОПРОТЕКТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ТРЕГАЛОЗЫ

Свойства молекулярного шаперона. Свойства трегалозы как природного крио- и биопротектора тесно связаны со свойствами молекулярного шаперона, способностью облегчать формирование природной/нативной конформации белков и уменьшать их агрегацию [28, 29]. Этим эффектом частично объясняли позитивное действие трегалозы при терапии моделей БХ [7], БП [29], БА [30]. Трегалоза способствовала формированию спиральной конформации амилоида- β ($A\beta$), препятствующей образованию его агрегатов, являющихся маркерами БА [31]. Она дифференциально подавляла агрегацию и нейротоксичность пептидов $A\beta$ 1-40 и $A\beta$ 1-42 [30]. На основании результатов биофизических и биохимических экспериментов была предложена следующая гипотеза, объясняющая стабилизацию фолдинга белков трегалозой. Молекулы трегалозы могут образовывать “покрывающий слой” (“coating layer”) вокруг белка, тем самым уменьшая количество водородных связей в системе белок-растворитель и сопутствующие силы электростатической сольватации. Такое уменьшение сольватации может быть причиной компенсирующего усиления внутрибелковых взаимодействий и, таким образом, стабилизации нативной структуры белка [32]. Кроме того, трегалоза оказалась способной сама индуцировать наработку внутриклеточных шаперонов, таких как HSP-70 [33], HSP90 и SigmaR1 [34], Hsp104p [35].

Индукция mTOR-независимого пути аутофагии. Считается, что основным терапевтическим механизмом действия трегалозы является активация mTOR-независимого пути аутофагии [8, 10] в противовес каноническому mTOR-зависимому пути (mTOR означает регуляторную киназу Mammalian Target Of Rapamycin). Недавно было показано, что действие трегалозы на гепатоциты ингибирует трансмембранный перенос глюкозы посредством транспортера SLC2A8 (известного также как GLUT8) [36], что приводит к снижению внутриклеточного уровня глюкозы. Данные Майера и соавторов [37] указывают на то, что трегалоза является одновременно транспортным субстратом (или лигандом) для GLUT8 и сопутствующим ингибитором транспорта глюкозы посредством этого переносчика. Падение концентрации глюкозы, в свою очередь, может запускать аутофагию посредством сигнализации “голодного состояния”, падения уровня АТФ, запускающего активацию регуляторной киназы AMPK. Примеча-

тельно, что при дефиците GLUT8 активации AMPK и индукции аутофагии в гепатоцитах не происходит как *in vitro*, так и *in vivo*, т.е. эффект, по-видимому, зависит от проникновения трегалозы в клетку через транспортер GLUT8 [37, 38]. Но, по-видимому, трегалоза проникает в клетки и другими путями. Нокаут GLUT8 не блокирует полностью трансмембранное проникновение трегалозы. В культуре гепатоцитов HepG2 трегалоза вызывает быструю активацию регуляторов аутофагии AMPK и ULK1 через специфические сайты фосфорилирования Thr172 и Ser317, соответственно [36], как описано для регуляторного пути AMPK-ULK1 [39, 40]. Инактивация AMPK предотвращает эффект трегалозы на стимуляцию фосфорилирования ULK1 (Ser317) и аутофагии. Примечательно, что модуляция активности GLUT8 лишь слабо влияет на трегалоза-зависимое дефосфорилирование mTOR и активацию mTOR-зависимой аутофагии через путь AMPK-TSC1/2-mTOR [37]. В организме мыши трегалоза довольно быстро всасывается в кишечнике с максимальной концентрацией в крови через 30 мин, при этом в печени наблюдается увеличение фосфорилирования AMPK по Thr172, затем происходит фосфорилирование ULK1 по Ser317 и активация аутофагии (оцениваемой по уровню LC3-II) [36].

Транспортер GLUT8 присутствует в нейронах коры, стриатуме и гиппокампе и способствует энергоснабжению головного мозга [41]. Согласно этим же экспериментам трегалоза может даже активировать переносчик глюкозы. Другие транспортеры семейства GLUT вообще не реагируют на трегалозу. Подавление активности GLUT8 трегалозой в мозге не подтверждено, и ассоциации метаболической мишени/сигнализатора глюкозы киназы AMPK с индукцией аутофагии трегалозой не происходило. В первичной культуре нейронов влияние трегалозы на активацию AMPK и аутофагии также не обнаружено [42]. Однако другие данные свидетельствуют об индукции трегалозой аутофагии в головном мозге посредством AMPK [43] или физических упражнений [43, 44]. На сегодня участие GLUT8, AMPK и ULK1 в индукции аутофагии в головном мозге трегалозой еще не получило убедительного экспериментального подтверждения, и связь между транспортером GLUT8 и индукцией аутофагии трегалозой в мозге до сих пор четко не обозначена. Таким образом, для клеток печени фосфорилирование AMPK приводит к передаче сигнала по “короткому” пути в направлении мощного регулятора аутофагии киназы ULK1 [36, 38, 45]. Активация аутофагии по этому пути также была показана для сахарозы и раффинозы, но не для некоторых других дисахаридов [46]. Хотя AMPK является центральной мишенью трегалозы, запускающей аутофагию, есть данные о том, что в культуре клеток позитивный эффект трегалозы связан не столько с ин-

дукцией аутофагии как таковой, а скорее, с созреванием аутофагосом и слиянием с ними лизосом [47]. Следует отметить, что аутофагосомы, индуцированные трегалозой, функционально активны, содержат поврежденный клеточный материал и сливаются с лизосомами даже при ингибировании аутофагии высоким уровнем глюкозы [48].

Относительно других регуляторных путей известно, что во фронтальной коре мышей трегалоза может повышать активность основного регулятора аутофагии Beclin1 или, по крайней мере, снижать соотношение p62/Beclin1 (зависимое от активности Beclin1) [49]. Терапевтический эффект индукции аутофагии трегалозой снижается у мышей с генотипом Beclin1 +/– в сравнении с диким типом, что указывает на посредничество регулятора Beclin1 [50]. Трегалоза может ингибировать фосфорилирование (активацию) киназы p38 MAPK [51], блокирующую mTOR-независимую аутофагию, и тем самым активировать аутофагию. Ряд работ [52–54] сообщает о способности трегалозы увеличивать транскрипцию связанных с аутофагией генов *Atg*, включая *Atg5* и *Atg7*.

Сообщается о влиянии трегалозы на аутофагию путем активации рецептора убиквитин-опосредованной аутофагии белка SQSTM1 (также известного как p62), потребляемого при селективной аутофагии [55]. Имеются ограниченные данные об индукции трегалозой аутофагии, опосредованной шаперонами. В частности, в фибробластах человека трегалоза повышает уровень медиатора шаперона HSC70 и ключевого белка шаперон-опосредованной аутофагии лизосомного мембранного транспортера LAMP2A, причем наряду с активацией генов аутофагии *Becn1* и *Atg5–Atg12* [33].

Стоит отметить, что индукция mTOR-независимой аутофагии и положительное влияние трегалозы на нейродегенерацию оспаривается рядом работ [14, 56]. Так, исследовали аутофаговый и лизосомный потоки в нейроноподобных клетках SH-SY5Y с использованием тандемного мечения белком tfLC3 (позволяющего различать аутофагосомы и аутолизосомы) и ингибиторов аутофагового потока [56]. Трегалоза индуцировала увеличение числа аутофагосом, но уменьшала количество аутолизосом и ингибировала слияние между аутофагосомами и лизосомами, тем самым оказывая кажущийся эффект активации аутофагии, регистрируемый как накопление LC3-II-меченых аутофагосом. Подобные результаты, свидетельствующие о нарушении аутофагового потока, были получены и на клетках нейроглиомы N4, где найдена кажущаяся активация аутофагии, выявляемая по уровню маркеров LC3-II и p62 [57]. Вероятно, в ряде случаев из-за такого негативного влияния на аутофаговый или лизосомный потоки трегалоза оказывает вредное или нейтральное

действие на моделях нейродегенерации *in vitro* [58, 59]. Тем не менее, подавляющее большинство экспериментальных исследований и, главное, исследования *in vivo* указывают на активацию mTOR-независимой аутофагии, опосредующей стабильное терапевтическое действие трегалозы на нейродегенерацию [10, 11, 60]. Ее ингибирование подавляет терапевтический эффект трегалозы [52].

Возможная индукция mTOR-зависимой аутофагии. Ранними исследованиями Саркара и соавт. [8] для трегалозы установлена регуляция аутофагии по mTOR-независимому пути. Вклад mTOR-зависимой сигнализации в активацию аутофагии трегалозой и конечные терапевтические эффекты не определен, хотя есть ряд экспериментальных указаний на такую возможность. Так, известно влияние трегалозы на регуляторный путь PI3K-Akt-mTOR [62] или путь AMPK–TSC1/2–Rheb-mTOR [63]. Для регуляторной киназы AMPK есть некая неопределенность. Она может передавать сигнал ниже посредством двух путей: напрямую активировать комплекс ULK1 (независимо от mTOR) [36] или, в конечном счете, ингибировать комплекс mTORC1 по “обходному” пути [63]. Хотя нет доказательств прямого действия трегалозы на мишень mTOR, при действии на клетки трегалозы происходит дефосфорилирование ULK1 по Ser757, регулируемое mTOR, что указывает на связь между двумя путями, регулирующими аутофагию [36, 38]. Для сигнальной цепочки AMPK–TSC1/2–Rheb-mTOR недостаточность TSC1/2 активирует передачу сигнала от AMPK непосредственно на ULK1 путем фосфорилирования киназы в положении Ser555 [64].

С другой стороны, в некоторых случаях, в частности, в культуре клеток гиппокампа индукция mTOR-зависимой аутофагии может влиять на активность mTOR-независимой аутофагии [65]. В других исследованиях блокирование mTOR-зависимой аутофагии путем фосфорилирования mTOR не ослабляло аутофагию, индуцированную трегалозой [66], то есть вклад mTOR-зависимого пути в суммарный эффект активации аутофагии трегалозой может быть незначительным.

Удаление aberrантных белков. Проблема удаления накапливающихся aberrантных белков, являющихся маркерами нейродегенеративных заболеваний, имеет несколько аспектов. Представляет интерес активность сегрегации aberrантных белков – какие формы склонных к агрегации патогенных белков попадают в индуцируемые аутофагосомы, и как эти процессы регулируются трегалозой. Возможность удаления aberrантных белков с помощью аутофагии, индуцированной трегалозой, по-видимому, впервые была выявлена в культурах клеток *in vitro* по снижению накопления хантингтина и α -синуклеина [8], при этом

удаление этих белков рассматривалось как потенциальный терапевтический эффект. Связь между индукцией аутофагии трегалозой и удалением олигомерных и агрегированных форм aberrантных белков установлена в ряде других работ. Трегалоза предотвращала накопление поли-убиквитинированных белков (α -синуклеина, тау и фосфорилированного тау), индуцированных ингибированием протеасомной активности в клетках нейробластомы человека, и, в конечном счете, ослабляла гибель клеток [52]. В другом случае активность аутофагии, индуцированной трегалозой, также была тесно связана с удалением цитотоксических поли-убиквитинированных белков и торможением гибели нейронов [67]. Действие трегалозы активирует удаление агрегатов тау и восстанавливает дофаминергические нейроны у некоторых трансгенных моделей гиперэкспрессии тау *in vivo* [68, 69]. Трегалоза ускоряла аутофаговый цикл и стимулировала удаление α -синуклеина в клетках PC12, моделирующих БП [70]. Более того, индуцированная трегалозой аутофагия может подавлять патологическую олигомеризацию α -синуклеина и повреждение нейронов в ткани головного мозга мышей, обработанных токсичным Mn [71].

Подобное “чистящее” действие трегалозы найдено на моделях БА *in vitro* и *in vivo* (у мышей линии APP23). Трегалоза существенно снижала наработку A β и накопление его агрегатов, ослабляла образования характерных бляшек и оказывала терапевтическое действие [30, 72]. В рамках нейродегенеративной модели накопления прионных белков в нейронах *in vitro* трегалоза уменьшала их накопление, и этот эффект был тесно связан с индукцией аутофагии, специально модулируемой для этой цели [73]. В данном случае трегалоза существенно снижала уровни нерастворимых агрегатов прионов. Точно так же обработка трегалозой клеток, инфицированных прионами, уменьшала размер агрегатов прионов и изменяла их внутриклеточную локализацию [74]. Иногда наблюдается противоположное действие трегалозы на клетки, связанное с нарушением целостности и функционирования лизосом и увеличением агрегации aberrантных белков [56], либо в культивируемых нейронах она не оказывала протективного действия в отношении агрегации белка α -синуклеина [59]. Однако чаще преобладает действие трегалозы по ослаблению патогенной олигомеризации aberrантных белков, зависимое как от аутофагии, так и от белок-стабилизирующих свойств препарата.

Активация биогенеза лизосом. Трегалоза обнаружила способность активировать белок, названный “магистром” биогенеза лизосом, транскрипционный фактор EB (TFEB) [75, 76]. Эта регуляция связана в первую очередь с киназой Akt, которая фосфорилирует TFEB в положении Ser467 и подавляет ядерную транслокацию TFEB неза-

висимо от mTOR. Трегалоза активирует перенос TFEB в ядро, ингибируя Akt без влияния на регуляторные киназы GSK3 β и ERK [77]. На мышечной модели лизосомной болезни накопления, связанной с нейродегенерацией, болезни Баттена, авторы нашли, что трегалоза снижала накопление сегрегированного материала, в частности, липолипидов и подавляла атрофию головного мозга, ослабляла нейровоспаление и существенно повышала продолжительность жизни мышей [77].

В клетках пигментного эпителия сетчатки глаза человека трегалоза индуцировала мРНК и белковую экспрессию TFEB, экспрессию генов аутофагии *ATG5* и *ATG7*, белковых маркеров макроаутофагии LC3B и p62 и некоторых лизосомных ферментов. Параллельно нашли активацию аутофагии, выявляемой по росту зернистости маркера GFP-LC3B, при этом цитопротективное действие зависело как от состояния аутофагии, так и от активации TFEB [54]. В другом исследовании была показана активация TFEB трегалозой и ее терапевтический эффект на модели поражения мотонейронов при боковом амиотрофическом склерозе (БАС) [76].

Роль TFEB в ослаблении нейродегенерации возрастает по мере того, как накапливаются данные об ингибирующем влиянии нейродегенерации на активность лизосомного потока, регулируемого TFEB [78, 79]. В частности, с этим связано аномальное накопление аутофагосом при БА и БП, зависимое от ослабления лизосомного потока [80].

Наконец, трегалоза может усиливать биогенез лизосом за счет активации другого фактора транскрипции FOXO1, который в нейронах регулирует группу генов аутофагии, включая *Atg8*, *Becn1*, *Sqstm1* и *Atg5* [53, 81].

Антиоксидантное действие. Свойство трегалозы оказывать антиоксидантное действие известно достаточно давно [82] и подкрепляется новыми данными. На модели клеток, зараженных прионом PrPSc, нашли, что трегалоза эффективно защищала клетки от окислительного стресса [83]. Она снижала уровень свободных радикалов в фибробластах, активируя аутофагию и улучшая состояние митохондрий [33]. Она ингибирует индуцированную H₂O₂ гибель дофаминергических клеток SH-SY5Y и стресс эндоплазматического ретикулума, зависимый от активных форм кислорода, и активирует киназу AMPK [84]. Антиоксидантная способность трегалозы была показана *in vivo* на модели БП у крыс [85]. В этом исследовании трегалоза активировала путь p62-Keap1-Nrf2, что приводило к повышенной экспрессии нижестоящих антиоксидантных ферментов, таких как глутатионредуктаза, глутатионпероксидаза и каталаза, и существенно защищала DA-эргические клетки черной субстанции. Найдено,

что трегалоза способна вызвать р62-зависимую транслокацию в ядро транскрипционного фактора эндогенной антиоксидантной защиты Nrf2 [60], активировать клеточные антиокислительные ресурсы и тем самым повысить клеточное выживание. Посредством влияния на регуляторный путь Keap1–Nrf2 трегалоза повышала экспрессию генов антиоксидантных белков и снижала индукцию активных форм кислорода, вызываемую митохондриальным токсином паракватом [60]. Однако связь между активностью Nrf2 и антиоксидантным эффектом, индуцируемым трегалозой, иногда подвергается сомнению. В некоторых работах высказывается, что выживанию клеток способствует лишь антиоксидантный эффект активации цитопротективной митофагии, стимулируемый трегалозой, а не активация Nrf2 [86, 87].

Отметим, что в нейронах головного мозга мышцей трегалоза ослабляет окислительное повреждение α -синуклеина, вызывая его пониженную олигомеризацию, и оказывает нейропротекцию [71]. Комплекс антиоксидантных эффектов трегалозы обеспечивает дополнительно к индукции аутофагии стимуляцию защиты от окислительного стресса, являющегося важным механизмом формирования нейродегенерации.

Противовоспалительное действие. Важным свойством трегалозы является ее способность ингибировать нейровоспаление, особенно на поздних стадиях процесса. Такой эффект трегалозы показан для активации микроглии и астроглии на хронической модели БП, вызываемой введением нейротоксина МФТП [29] или на моделях эндоксинного шока *in vitro* и *in vivo* [88, 89]. Положительный эффект трегалозы был связан со снижением активации транскрипционного фактора NF- κ B, регулирующего высвобождение провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6 и TNF- α) [90]. Другой эффект трегалозы связан с подавлением Toll-подобного рецептора-4 (TLR-4), что приводит к защитному эффекту на модели воспаления, индуцированного липополисахаридом [88]. В обработанных липополисахаридом клетках микроглии BV2 трегалоза отдельно [90] или в сочетании с рапамицином [91] значительно снижала уровни провоспалительных медиаторов, включая NO. Между тем, противовоспалительный эффект трегалозы, по-видимому, во многом связан с индукцией аутофагии [61], которая может ослаблять активацию инфламмасом, связанных с провоспалительными цитокинами [92]. В других экспериментах положительный эффект трегалозы по торможению нейровоспаления и гибели нейронов отменялся ингибированием аутофагии 3-метилденином [91].

Связь с убиквитин-протеасомной системой. Позитивные свойства трегалозы обнаружены во влиянии на убиквитин-протеасомную систему,

составляющую вместе с аутофагией цитопротективную систему контроля качества белка. Результаты по протективному действию трегалозы на протеасомы получены на клеточных культурах. Так, цитопротективный эффект трегалозы найден на клетках нейробластомы человека NB69, обработанных эпоксимицином, ингибитором протеасом [52]. Трегалоза тормозила зависимость от недостаточности протеасом накопление полиубиквитинированных белков, общего и фосфорилированного белка тау и α -синуклеина, а также снижала уровень внутриклеточных агрегатов α -синуклеина и активацию ERK, вызывающую эпоксимицин-индуцированную гибель клеток. Можно отметить, что трегалоза защищает протеасомы от повреждения также в нейроноподобных клетках SH-SY5Y, что, впрочем, связывают больше с индуцируемым трегалозой ингибированием окислительного стресса и стресса ЭПР [93].

ВОЗМОЖНОСТИ ТРЕГАЛОЗЫ В ТОРМОЖЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

Нейропротективный эффект трегалозы преимущественно связан с индукцией аутофагии, поскольку на клеточных моделях нейродегенерации терапевтический эффект трегалозы зависел от индукции аутофагии и пропал при ее ингибировании 3-метилденином [2, 52]. Влияние трегалозы на экспериментальную нейродегенерацию сильно различается в зависимости от конкретных особенностей моделей заболевания, включая тип индукции (фармакологический или генетический), моделирование острых или хронических процессов, сочетание нейротоксических факторов. С другой стороны, применяются разные режимы лечения трегалозой, включая пероральное или парентеральное применение, разные дозы и длительность лечения, комбинирование с другими лекарственными препаратами и т.д. Основные данные по лечению трегалозой экспериментальной нейродегенерации были получены на моделях БА и БП при пероральном ее использовании с питьем в виде 2% раствора.

Болезнь Альцгеймера. БА, наиболее распространенное нейродегенеративное заболевание, является и наиболее частой причиной деменции [94]. Формирование болезни обычно связывается с накоплением пептида А β , образующего на клеточной поверхности амилоидные бляшки. Другим проявлением является внутриклеточная агрегация гиперфосфорилированного белка тау в характерные внутриклеточные белковые клубки. В норме избыточно синтезируемые белки помечаются убиквитиновой меткой, направляющей их в протеасомы для расщепления. Однако для аномальных белков (мутантных или модифицированных) нативная пространственная конформация нару-

шается, аномально свернутые белки приобретают токсические свойства и ускользают от расщепления по механизмам убиквитин-протеасомной деградации и шаперон-опосредованной аутофагии, они ассоциируют с образованием агрегатов. Далее формирование БА сопровождается индукцией воспаления (активацией микроглии) и гибелью нейронов в миндалевидном теле, коре мозга и гиппокампе [95].

При БА накапливающийся А β получается протеолитическим расщеплением белка-предшественника (APP). В присутствии трегалозы А β приобретает более упорядоченную, спиральную структуру, что ослабляет агрегацию белка и появление включений [96]. В клетках SH-SY5Y снижение агрегации А β более выражено для фрагмента А β 1–40, чем для А β 1–42, и коррелирует со снижением цитотоксичности А β [30].

На клеточной модели БА найдено, что трегалоза подавляет накопление, секрецию и токсичность А β [97]. Цитопротективный эффект трегалозы, опосредованный торможением накопления белковых агрегатов, также был показан для гиперэкспрессии белка тау [98]. Трегалоза уменьшала накопление тау и повышала жизнеспособность нейронов на модели таупатии у мышей [99]. Следует отметить, что тау важен для патогенеза БА, поскольку нокаут его гена может ослабить нейродегенерацию, вызванную накоплением А β [100].

Основной терапевтический эффект трегалозы на моделях БА связывают с активацией аутофагии. На трансгенных мышах, моделирующих гиперэкспрессию А β , активация аутофагии трегалозой снижала уровень А β и фосфорилированного тау, тормозила апоптоз нейронов в гиппокампе и коре мозга, ослабляла астроглиоз [101]. На фармакологической модели БА, индуцированной инъекцией в гиппокамп олигомерного А β 25–35 [102], трегалоза вызывала аутофагию, уменьшала нейровоспаление и ослабляла дефицит краткосрочной памяти и восстанавливала обучаемость. На подобной модели БА, индуцированной инъекцией олигомерного А β 25–35 в желудочки мозга, терапевтический эффект трегалозы был даже более заметным, чем при классической активации аутофагии рапамицином, а наибольший результат был получен с помощью комбинированного лечения трегалозой и рапамицином [103].

У трансгенных мышей линии Tg2576, характеризующейся гиперэкспрессией А β , трегалоза активировала аутофагию, снижала уровень фосфорилированного тау, тау-клубков и агрегатов А β , ингибировала апоптоз нейронов гиппокампа и коры, но не предотвращала усиление астроглиоза [104]. Хорошие результаты были получены на модели таупатии в сочетании с паркинсонизмом (мышь линии РК–/–/ТауV Δ LW), характеризующейся гиперэкспрессией мутантного тау вместе с

делецией гена *PARK2* (белка Parkin) [67]. В этом исследовании 4-месячное лечение мышей трегалозой снизило гибель DA-эргических нейронов в среднем мозге, уровень фосфорилированного тау и количество внутриклеточных включений, ослабило астроглиоз. Позитивный эффект связывали с активацией аутофагии, согласующейся с подавлением накопления тау и астроглиоза. Тем не менее, трегалоза не вызвала восстановления DA-эргических нейритов в стриатуме. У 14-месячных мышей также был получен положительный эффект, заключавшийся в снижении уровня фосфорилированного тау и количества амилоидных бляшек, тем самым улучшались двигательные функции и уменьшалась тревожность [67]. Точно так же на трансгенной модели БА у мышей линии APP/PS1 трегалоза подавляла накопление А β в гиппокампе, восстанавливала способность к обучению и когнитивную функцию [105]. Тем не менее, в некоторых исследованиях на трансгенных мышах не найдены ожидаемые эффекты трегалозы по снижению накопления А β и значительной активации аутофагии, несмотря на улучшение когнитивных функций [104].

Болезнь Паркинсона. БП свойственны нарушения двигательной активности, выражающиеся в дрожании рук, ног, мышц шеи, нарушениях координации движений, поздней деменции [96, 106]. У людей лишь 5–10% заболеваемости связаны с мутациями различных генов, остальные случаи имеют спорадическую природу. Болезнь вызывается ранним поражением дофамин (DA)-эргических нейронов в черной субстанции (substantia nigra) и полосатом теле (striatum). В нейронах накапливаются аномальные формы белка α -синуклеина с дефектами пространственной структуры. Мутантные белки способны тормозить их собственную деградацию, тогда как избыток интактных белков эффективно расщепляется посредством протеасом и шаперон-опосредованной аутофагии. Болезнь может быть вызвана, например, гиперэкспрессией A53T-мутантного α -синуклеина. Гибель нейронов связывается с массивным внутриклеточным накоплением токсичных форм α -синуклеина, приводящей к агрегации их в тельца Леви, и нейровоспалением с участием глии и воспалительных цитокинов [107]. Нейропротективное действие зависит от удаления α -синуклеина, влияющего на восстановление жизнеспособности и функциональной активности DA-эргических нейронов.

Изучение клеточных моделей БП показало действие трегалозы по снижению уровня быстро агрегирующегося A53T-мутантного α -синуклеина, зависимость как от уровня протеасом [96], так и от активности аутофагии [108, 109]. Цитопротективный эффект трегалозы в клетках PC12, обработанных ротеноном, состоял в активации удаления α -синуклеина и ингибировании чрезмерного

накопления аутофагосом [69]. По-видимому, этот эффект трегалозы можно связать с активацией индуктора лизосомного потока транскрипционного фактора TFEB, способствующего, в конечном счете, удалению аутофагосом.

В исследованиях лаборатории Рубинштейна проверялась возможность усилить позитивное действие трегалозы в клеточных системах за счет комбинации трегалозы с рапамицином, являющимся классическим индуктором mTOR-зависимой аутофагии. Одна трегалоза значительно снижала содержание мутантных белков хантингтина и α -синуклеина, а комбинация с рапамицином оказывала наибольший (аддитивный) эффект [8]; и оба препарата защищали клетки от проапоптозного повреждения митохондрий.

Терапевтический эффект трегалозы был показан на разнообразных моделях БП *in vivo*. Так, повреждение нейронов вызывали длительным введением нейротоксина МФТП, селективно действующего на DA-эргические нейроны [29]. В этих условиях трегалоза восстанавливала уровень тирозингидроксилазы (маркера жизнеспособности и функциональной активности DA-эргических нейронов), транспортера DA DAT и транспорт DA в черной субстанции и среднем мозге. Она значительно ослабляла воспалительную активацию микроглии, гипертрофию астроцитов и локальное воспаление в целом. Важно, что достигалось снижение повреждения мотонейронов, моторной недостаточности.

В наших исследованиях модели БП у мышей, вызванной введением МФТП, трегалоза активировала аутофагию в нейронах черной субстанции, что способствовало восстановлению DA-эргических нейронов nigrostriарной системы и когнитивной функции, оцениваемой в тесте пассивного избегания (УРПИ) [110].

Обнадешивающие результаты были также получены на модели БП, вызванной 6-гидроксиаминамином, у крыс [111]. Лечение модели питьем 3%-го раствора трегалозы улучшало двигательную активность крыс, по-видимому, за счет уменьшения повреждений DA-эргических нейронов черной субстанции. Трегалоза существенно восстанавливала плотность нейронов черной субстанции, концентрацию DA и его метаболитов, экспрессию антиоксидантных ферментов. Терапевтический эффект был связан с активацией как неканонического регуляторного пути $p62$ –Keap1–Nrf2, так и аутофагии. Аналогичные результаты получены для модели БП, индуцированной МФТП, при сравнении действия трегалозы, лактулозы или мелибиозы, при этом лучшее действие показано для лечения трегалозой [112].

На модели БП, вызванной ротеноном, трегалоза увеличивала жизнеспособность DA-эргических нейронов черной субстанции мозга мышей

[113]. Действие трегалозы на различные терапевтические мишени при БП изучали на модели деменции с тельцами Леви, сопровождающейся обильным накоплением в синаптических окончаниях и телах нейронов нерастворимого α -синуклеина [34]. Трегалоза стимулировала аутофагию как в культуре клеток, так и в мозге мышей. Было показано снижение уровня нерастворимого α -синуклеина без влияния на его агрегацию, торможение апоптоза нейронов nigrostriарума.

Положительные результаты были получены на трансгенной модели БП у крыс с гиперэкспрессией A53T-мутантного α -синуклеина. Трегалоза вызывала снижение накопления агрегатов α -синуклеина, активацию аутофагии в стриатуме, улучшение метаболизма DA, снижение гибели DA-эргических нейронов и ослабление моторных нарушений в поведенческих тестах [114].

Некоторые авторы на основании результатов *in vitro* сомневаются в способности трегалозы активировать удаление белковых агрегатов и индуцировать аутофагию [14, 74]. Между тем, большинство исследований, а главное, результаты исследований на животных свидетельствуют о позитивном терапевтическом действии трегалозы на моделях БП [60, 76, 115].

Болезнь Хантингтона. При БХ наблюдается относительно раннее нарушение моторной и когнитивной активности, сопровождающееся потерей самоориентации, депрессией, развитием деменции [10]. На клеточном уровне происходит выраженное накопление и агрегация токсических поли-глутаминовых (polyQ) пептидов, мутантного хантингтина (mHtt), способных блокировать убиквитин-протеасомную систему. Накопление аномальных белков приводит к образованию амилоидных фибрилл, являющихся маркерами заболевания. Повреждаются в основном нейроны стриатума.

Молекулярным маркером заболевания является белок хантингтин, склонный к накоплению и агрегации. В клеточных системах трегалоза предотвращала агрегацию мутантного хантингтина (mHtt) и α -синуклеина [8], снижала содержания агрегатов mHtt [116] и ингибировала наработку агрегатов поли-убиквитинированных белков, индуцированных эпоксимицином [52]. Терапевтический эффект трегалозы связывают с индукцией аутофагии. Аналогичный результат по влиянию трегалозы на агрегацию белков и терапевтическое действие на головной мозг и печень мышей на трансгенной модели БХ был получен в лаборатории профессора Танака [7]. Терапия трегалозой вызывала улучшение двигательной функции и продлевала жизнь мышей. Воспалительная активация микроглии мозга, возникающая при БХ и других нейродегенеративных заболеваниях и уси-

ливающая повреждение нейронов, подавлялась лечением мышшей трегалозой.

Окулофарингеальная мышечная дистрофия (ОФМД). Данное заболевание вызвано избыточной экспрессией полиА-связывающего ядерного белка 1 (PABPN1). Аномально экспрессируемый белок агрегирует в ядрах скелетных мышечных волокон. Трансгенная модель заболевания у мышшей воспроизводит болезнь человека и моделирует прогрессирующую мышечную слабость, вызванную накоплением белка в ядрах миоцитов [117]. На сегодняшний день заболевание не поддается эффективному фармакологическому лечению.

Лечение модели ОФМД трегалозой показало, что она способна связывать и стабилизировать аномально свернутые белки и ингибировать образование агрегатов. На клеточных моделях ОФМД трегалоза уменьшала образование агрегатов мутантного белка PABPN1 и его токсичность. На мышшах лечение 2%-м раствором трегалозы с питьем снижало мышечную слабость, подавляло образование агрегатов и уменьшало количество дефектных ядер [118, 119]. Проведенные исследования стали основанием для перехода к клиническим испытаниям [120, 121]. Трегалозу в виде 9% раствора (препарат Cabaletta®) вводили внутривенно в режиме 30 г трегалозы еженедельно в течение 9–16 нед., что было признано безопасным [120]. Лечение с помощью данного препарата в течение 24 нед. улучшало результаты функциональных тестов глотания, мышечной силы и качества жизни [121].

Боковой амиотрофический склероз (БАС). БАС включает повреждение двигательных нейронов из-за накопления аномально свернутой супероксиддисмутазы 1. Отложение aberrантного фермента вероятно связано с ослаблением контроля качества белка [93]. Трегалоза способна снижать накопление аномального фермента в культуре клеток [122] и *in vivo* [123], а также ослаблять моторную недостаточность. В других исследованиях терапевтический эффект трегалозы достигался за счет активации аутофагии, опосредованной фактором транскрипции FOXO1 [52], либо терапевтический эффект связывали с ослаблением негативного действия микроглии на моторные нейроны и защитой митохондрий от повреждения [124]. Активация FOXO1 важна потому, что этот транскрипционный фактор регулирует экспрессию группы генов аутофагии, таких как *Atg8*, *Sqstm1*, *Becn1* и *Atg5* и может вызвать согласованную индукцию компонентов аутофагового ответа [94]. На мутантной модели БАС показана способность трегалозы повышать жизнеспособность нейронов мозга и продлевать срок жизни мутантных мышшей [53]. В целом, показана высокая терапевтическая эффективность трегалозы в лечении БАС в эксперименте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нейродегенеративные заболевания имеют сложную природу, в их патогенез вовлечены помимо нарушений протеостаза различные процессы, которые тесно взаимодействуют и пересекаются, такие как окислительный стресс, нейровоспаление, нарушения митохондриальной функции, ионного гомеостаза клеток, нейротрофической функции, нейрогенеза и пр. Поэтому современной тенденцией при разработке подходов к коррекции нейродегенеративных заболеваний становится формирование многоцелевых комбинированных патогенетически важных воздействий (combination-drugs-multi-targets, CDMT), не вызывающих отрицательных эффектов [125]. Терапевтический потенциал трегалозы обусловлен набором ее биологических активностей, полезных в отношении патогенетических механизмов нейродегенерации (рис. 1). В частности, она обладает шапероноподобной активностью, ослабляющей образование аномально свернутых белков, склонных к агрегации. Например, трегалоза способствует формированию α -сферической структуры А β , что препятствует агрегации этого пептида. Пластичность пространственной структуры трегалозы обусловлена гибкостью α -1-1'-гликозидной связи. По-видимому, эта особенность придает трегалозе способность проявлять шапероно-подобные свойства и отличает ее от таких дисахаридов, как сахароза и раффиноза [46] или лактулоза и мелибиоза [112], которые также могут умеренно усиливать аутофагию, но проявляют ограниченную цитопroteкцию.

Основным механизмом, лежащим в основе цито- и нейропротективных эффектов трегалозы, выступает активация аутофагии, направленная на удаление склонных к агрегации белков на разных стадиях образования агрегатов, а также на сегрегацию надмолекулярного клеточного материала. Эта функция является частью более обширной системы контроля качества белка. Направленное ингибирование аутофагии в значительной степени лишает трегалозу ее нейропротективной активности [126]. Трегалоза запускает “альтернативный” mTOR-независимый путь активации аутофагии, и этот путь, по-видимому, лишен побочных эффектов mTOR-зависимой активации аутофагии, которые известны для рапамицина и его аналогов (т.н. плейотропный эффект) [127].

Трегалоза активировать не только аутофагию как сегрегацию клеточного материала, но и лизосомный поток, предназначенный для последующего расщепления сегрегированного материала. Активация ослабленного лизосомного потока важна при таких заболеваниях как БП, БА, при старении. Восстановление лизосомного потока трегалозой осуществляется посредством регуляторов транскрипции факторов TFEB и FOXO1. При па-

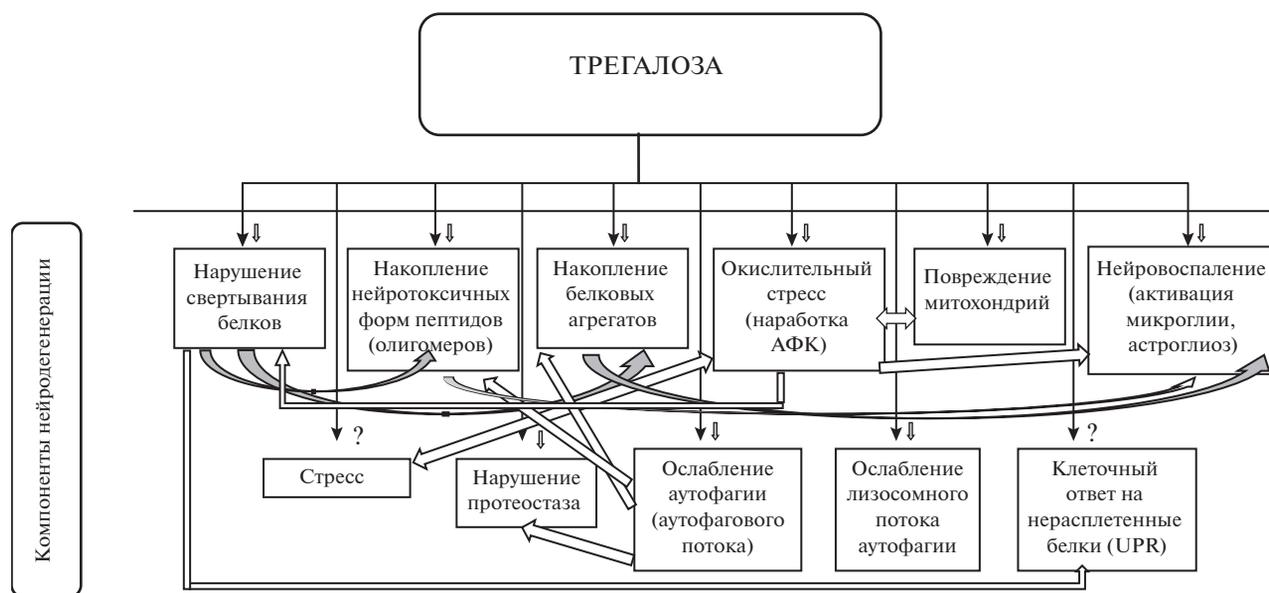


Рис. 1. Терапевтический потенциал трегалозы в отношении патогенетических механизмов нейродегенерации. Примечание: Крупные полые стрелки отображают основные взаимодействия между процессами, вовлеченными в развитие нейродегенерации. Мелкие стрелки, заполненные серым, обозначают ослабление патологического процесса под действием трегалозы.

тологиях, связанных с индукцией окислительного стресса и повреждением митохондрий, например, таких как БП, важной стратегией лечения является восстановление редокс-баланса. Трегалоза индуцирует эндогенную антиоксидантную защиту путем активации регулятора Nrf2, и стимуляции митофагии поврежденных органелл, генерирующих активные формы кислорода. Подавление окислительного стресса трегалозой обычно связано со снижением нейровоспаления, которое также губительно для нейронов. Таким образом, трегалоза оказывает одновременное действие на несколько патогенетически важных молекулярных и клеточных мишеней, и может рассматриваться как многоцелевое терапевтическое средство, что определяет ее эффективность в лечении экспериментальной нейродегенерации.

Несмотря на успехи в лечении экспериментальных моделей заболеваний, испытание трегалозы в клинике проводится недостаточно широко. Позитивные результаты получены в офтальмологии [128], алиментарным применением препарата в отношении артериального старения [129], стеатоза печени [36]. Ряд заболеваний с нейродегенеративной компонентой достаточно успешно лечили внутривенным введением препарата Cabaletta. Хорошие результаты показаны в отношении ОФМД [121], спино-церебральной атаксии 3 (болезни Мачадо–Йозефа) [130], болезни Нимана–Пика С [24]. Ограниченность клинических испытаний трегалозы является следствием, с одной

стороны, недостаточного соответствия воспроизведения болезней на животных с течением заболеваний у человека, а с другой стороны, ограниченной возможностью перенесения терапевтических приемов применения трегалозы с животных на человека, в частности, недостаточной изученностью фармакодинамики препарата при пероральном применении [131]. Так, лечение пациентов трегалозой *per os* не находит широкого применения в клинике, отдается предпочтение внутривенной терапии трегалозой. Тем не менее, активно развиваются исследования, направленные на усиление терапевтических свойств трегалозы при пероральном применении – такие, например, как повышение биодоступности, увеличение ее абсорбции из кишечника и проникновения через клеточные мембраны [132, 133], при одновременном снижении возможного побочного действия [134]. В настоящее время заявлены большие планы в лечении трегалозой различных нейродегенеративных и редких заболеваний парэнтеральным способом (<https://patents.google.com/patent/EP2994145A2/en>; <https://adisinsight.springer.com/drugs/800039496>). Важно, что трансляционный переход к клиническим испытаниям препарата основывается на достигнутых результатах по эффективности трегалозы в отношении экспериментальной нейродегенерации и мультитаргетном действии препарата.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 23-25-00393 (2023–2024 гг.).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vassar R., Zheng H. // *Mol. Neurodegener.* 2014. V. 9. P. 34.
2. Basha F.H., Waseem M., Srinivasan H. // *Cell. Biochem. Funct.* 2021. V. 39. № 5. P. 613–622.
3. Kurtishi A., Rosen B., Patil K.S., Alves G.W., Møller S.G. // *Mol. Neurobiol.* 2019. V. 56. № 5. P. 3676–3689.
4. Leszek J., Barreto G.E., Gąsiorowski K., Koutsouraki E., Ávila-Rodríguez M., Aliev G. // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2016. V. 15. № 3. P. 329–336.
5. Kwon H.S., Koh S.H. // *Transl. Neurodegener.* 2020. V. 9. № 1. P. 42.
6. Corti O., Blomgren K., Poletti A., Beart P.M. // *J. Neurochem.* 2020. V. 154. № 4. P. 354–371.
7. Tanaka M., Machida Y., Niu S., Ikeda T., Jana N.R., Doi H., Kurosawa M., Nekooki M., Nukina N. // *Nat. Med.* 2004. V. 10. № 2. P. 148–154.
8. Sarkar S., Davies J.E., Huang Z., Tunnacliffe A., Rubinsztein D.C. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 8. P. 5641–5652.
9. Rodríguez-Navarro J.A., Rodríguez L., Casarejos M.J., Solano R.M., Gómez A., Perucho J., Cuervo A.M., García de Yébenes J., Mena M.A. // *Neurobiol. Dis.* 2010. V. 39. № 3. P. 423–438.
10. Hosseinpour-Moghaddam K., Caraglia M., Sahebkar A. // *J. Cell Physiol.* 2018. V. 233. № 9. P. 6524–6543.
11. Thellung S., Corsaro A., Nizzari M., Barbieri F., Florio T. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 4. pii: E901.
12. Rubinsztein D.C., Bento C.F., Deretic V. // *J. Exp. Med.* 2015. V. 212. № 7. P. 979–990.
13. Byun S., Lee E., Lee K.W. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 9. pii: E1959.
14. Lee H., Yoon Y.S., Lee S.J. // *Cell Death Dis.* 2018. V. 9. № 7. P. 712–720.
15. Liu M., Zhang M., Ye H., Lin S., Yang Y., Wang L., Jones G., Trang H. // *Food Chem.* 2013. V. 136. № 2. P. 485–490.
16. Stewart S., He X. // *Langmuir.* 2018. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02015>
17. Arguelles J.C. // *J. Mol. Evol.* 2014. V. 79. P. 111–116.
18. Martano G., Gerosa L., Prada I., Garrone G., Krogh V., Verderio C., Passafaro M. // *ACS Chem. Neurosci.* 2017. V. 8. P. 1865–1872.
19. van Elburg R.M., Uil J.J., Kokke F.T., Mulder A.M., van de Broek W.G., Mulder C.J., Heymans H.S. // *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 1995. V. 20. № 2. P. 184–188.
20. Kamiya T., Hirata K., Matsumoto S., Arai C., Yoshizane C., Kyono F., Ariyasu T., Hanaya T., Arai S., Okura T., Yamamoto K., Ikeda M., Kurimoto M. // *Nutr. Res.* 2004. V. 24. № 2. P. 185–196.
21. Howson P.A., Johnston T.H., Ravenscroft P., Hill M.P., Su J., Brochie J.M., Koprach J.B. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2019. V. 369. № 3. P. 364–374.
22. Di Rienzi S.C., Britton R.A. // *Adv. Nutr.* 2020. V. 11. № 3. P. 616–629.
23. Sahebkar A., Hatamipour M., Tabatabaei S.A. // *J. Cell Biochem.* 2019. V. 120. № 6. P. 9455–9459.
24. Mobini M., Radbakhsh S., Kubaski F., Eshraghi P., Vakili S., Vakili R., Khalili M., Varesvazirian M., Jamialahmadi T., Alamdaran S.A., Sayedi S.J., Rajabi O., Emami S.A., Reiner Ž., Sebkar A. // *J. Clin. Med.* 2022. V. 11. № 1. P. 247.
25. Felice V.D., Quigley E.M., Sullivan A.M., O’Keeffe G.W., O’Mahony S.M. // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2016. V. 27. P. 1–8.
26. Macias-Ceja D.C., Cosín-Roger J., Ortiz-Masiá D., Salvador P., Hernández C., Esplugues J.V., Calatayud S., Barrachina M.D. // *Br. J. Pharmacol.* 2017. V. 174. № 15. P. 2501–2511.
27. Arai C., Arai N., Arai S., Yoshizane C., Miyata S., Mizote A., Suyama A., Endo S., Ariyasu T., Mitsuzumi H., Ushio S. // *Nutr. Metabol.* 2019. V. 16. P. 45.
28. Kaushik J.K., Bhat R. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 28. P. 26458–26465.
29. Sarkar S., Chigurupati S., Raymick J., Mann D., Bowyer J.F., Schmitt T., Beger R.D., Hanig J.P., Schmued L.C., Paule M.G. // *Neurotoxicology.* 2014. V. 44. P. 250–262.
30. Liu R., Barkhordarian H., Emadi S., Park C.B., Sierks M.R. // *Neurobiol. Dis.* 2005. V. 20. P. 74–81.
31. Khan S.H., Kumar R. // *Pathol. Res. Pract.* 2017. V. 213. № 6. P. 643–648.
32. Lins R.D., Pereira C.S., Hünenberger P.H. // *Proteins.* 2004. V. 55. № 1. P. 177–186.
33. Casarejos M.J., Perucho J., Lopez-Sendon J.L., Garcia de Yébenes J., Bettencourt C., Gomez A., Ruiz C., Heutink P., Rizzu P., Mena M.A. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 9. P. e106931.
34. Tanji K., Miki Y., Maruyama A., Mimura J., Matsumiya T., Mori F., Imaizumi T., Itoh K., Wakabayashi K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. V. 465. № 4. P. 746–752.
35. Chaudhary R.K., Kardani J., Singh K., Banerjee R., Roy I. // *Neuromolecular Med.* 2014. V. 16. № 2. P. 280–291.
36. DeBosch B.J., Heitmeier M.R., Mayer A.L., Higgins C.B., Crowley J.R., Kraft T.E., Chi M., Newberry E.P., Chen Z., Finck B.N., Davidson N.O., Yarasheski K.E., Hruz P.W., Moley K.H. // *Sci. Signal.* 2016. V. 9. № 416. P. ra21.
37. Mayer A.L., Higgins C.B., Heitmeier M.R., Kraft T.E., Qian X., Crowley J.R., Hyrc K.L., Beatty W.L., Yarasheski K.E., Hruz P.W., DeBosch B.J. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 38586.
38. Mardones P., Rubinsztein D.C., Hetz C. // *Sci. Signal.* 2016. V. 9. № 416. P. fs2.
39. Egan D., Kim J., Shaw R.J., Guan K.L. // *Autophagy.* 2011. V. 7. № 6. P. 643–644.
40. Roach P.J. // *Mol. Cell. Biol.* 2011. V. 31. № 15. P. 3082–3084.

41. Narita H., Tanji K., Miki Y., Mori F., Wakabayashi K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. V. 514. № 3. P. 672–677.
42. Benito-Cuesta I., Ordonez-Gutierrez L., Wandosell F. // *Metabolites.* 2021. V. 11. № 7. P. 421.
43. Chen M., Huang N., Liu J., Huang J., Shi J., Jin F. // *Behav. Brain Res.* 2021. V. 400. P. 113043.
44. Huang J., Wang X., Zhu Y., Li Z., Zhu Y.T., Wu J.C., Qin Z.H., Xiang M., Lin F. // *Neurosci. Ther.* 2019. V. 25. № 6. P. 796–807.
45. Djajadikerta A., Keshri S., Pavel M., Prestil R., Ryan L., Rubinsztein D.C. // *J. Mol. Biol.* 2020. V. 432. № 8. P. 2799–2821.
46. Chen X., Li M., Li L., Xu S., Huang D., Ju M., Huang J., Chen K., Gu H. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 28423.
47. Jang M., Park R., Kim H., Namkoong S., Jo D., Huh Y.H., Jang I.S., Lee J.I., Park J. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 12637.
48. Xu C., Chen X., Sheng W.B., Yang P. // *Reprod. Toxicol.* 2019. V. 85. P. 51–58.
49. Kara N.Z., Tokar L., Agam G., Anderson G.W., Belmaker R.H., Einat H. // *Psychopharmacology.* 2013. V. 229. № 2. P. 367–375.
50. Sciarretta S., Yee D., Nagarajan N., Bianchi F., Saito T., Valenti V., Tong M., Del Re D.P., Vecchione C., Schirone L., Forte M., Rubattu S., Shirakabe A., Boppana V.S., Volpe M., Frati G., Zhai P., Sadoshima J. // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2018. V. 71. № 18. P. 1999–2010.
51. Wang Q., Ren J. // *Pharmacol. Res.* 2016. V. 111. P. 357–373.
52. Casarejos M.J., Solano R.M., Gomez A., Perucho J., de Yébenes J.G., Mena M.A. // *Neurochem. Int.* 2011. V. 58. № 4. P. 512–520.
53. Castillo K., Nassif M., Valenzuela V., Rojas F., Matus S., Mercado G., Court F.A., van Zundert B., Hetz C. // *Autophagy.* 2013. V. 9. № 9. P. 1308–1320.
54. Abokyi S., Shan S.W., To C.H., Chan H.H., Tse D.Y. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020. V. 2020. P. 5296341.
55. Lamark T., Svenning S., Johansen T. // *Essays Biochem.* 2017. V. 61. № 6. P. 609–624.
56. Yoon Y.S., Cho E.D., Jung Ahn W., Won Lee K., Lee S.J., Lee H.J. // *Cell Death Dis.* 2017. V. 8. № 10. P. e3091.
57. Tien N.T., Karaca I., Tamboli J.Y., Walter J. // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. № 20. P. 10528–10540.
58. Lan D.M., Liu F.T., Zhao J., Chen Y., Wu J.J., Ding Z.T., Yue Z.Y., Ren H.M., Jiang Y.P., Wang J. // *Neurochem. Res.* 2012. V. 37. № 9. P. 2025–2032.
59. Redmann M., Wani W.Y., Volpicelli-Daley L., Darley-Usmar V., Zhang J. // *Redox Biol.* 2017. V. 11. P. 429–437.
60. Mizunoe Y., Kobayashi M., Sudo Y., Watanabe S., Yasukawa H., Natori D., Hoshino A., Negishi A., Okita N., Komatsu M., Higami Y. // *Redox Biol.* 2018. V. 15. P. 115–124.
61. Khalifeh M., Barreto G.E., Sahebkar A. // *Br. J. Pharmacol.* 2019. V. 176. № 9. P. 1173–1189.
62. Pierzynowska K., Gaffke L., Cyske Z., Puchalski M., Rintz E., Bartkowski M., Osiadly M., Pierzynowski M., Mantej J., Piotrowska E., Wegryzn G. // *Metab. Brain Dis.* 2018. V. 33. № 4. P. 989–1008.
63. Tamargo-Gomez I., Marino G. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 12. P. 3812.
64. Di Nardo A., Wertz M.H., Kwiatkowski E., Tsai P.T., Leech J.D., Greene-Colozzi E., Goto J., Dilsiz P., Talos D.M., Clish C.B., Kwiatkowski D.J., Sahin M. // *Hum. Mol. Genet.* 2014. V. 23. № 14. P. 3865–3874.
65. Zimmerman M.A., Biggers C.D., Li P.A. // *BMC Neurosci.* 2018. V. 19. № 1. P. 82.
66. Sarkar S. // *Biochem. Soc. Trans.* 2013. V. 41. № 5. P. 1103–1130.
67. Casarejos M.J., Perucho J., Gomez A., Munoz M.P., Fernandez-Estevez M., Sagredo O., Fernandez Ruiz J., Guzman M., de Yébenes J.G., Mena M.A. // *J. Alzheimers Dis.* 2013. V. 35. № 3. P. 525–539.
68. Rodriguez-Navarro J.A., Rodriguez L., Casarejos M.J., Solano R.M., Gomez A., Perucho J., Cuervo A.M., Garcia de Yébenes J., Mena M.A. // *Neurobiol. Dis.* 2010. V. 39. № 3. P. 423–438.
69. Schaeffer V., Lavenir I., Ozcelik S., Tolnay M., Winkler D.T., Goedert M. // *Brain.* 2012. V. 135. Pt. 7. P. 2169–2177.
70. Wu F., Xu H.D., Guan J.J., Hou Y.S., Gu J.H., Zhen X.C., Qin Z.H. // *Neuroscience.* 2015. V. 284. P. 900–911.
71. Jing M.J., Liu K., Liu C., Yan D.Y., Ma Z., Wang C., Deng Y., Liu W., Xu B. // *Environ. Toxicol.* 2020. V. 35. № 1. P. 55–65.
72. Liu Y., Wang J., Hsiung G.R., Song W. // *Mol. Neurobiol.* 2020. V. 57. № 7. P. 3150–3157.
73. Aguib Y., Heiseke A., Gilch S., Riemer C., Baier M., Schatzl H.M., Ertmer A. // *Autophagy.* 2009. V. 5. № 3. P. 361–369.
74. Beranger F., Crozet C., Goldsborough A., Lehmann S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 374. № 1. P. 44–48.
75. Settembre C., Di Malta C., Polito V.A., Garcia Arencibia M., Vetrini F., Erdin S., Erdin S.U., Huynh T., Medina D., Colella P., Sardiello M., Rubinsztein D.C., Ballabio A. // *Science.* 2011. V. 332. № 6036. P. 1429–1433.
76. Rusmini P., Cortese K., Crippa V., Cristofani R., Cicardi M.E., Ferrari V., Vezzoli G., Tedesco B., Meroni M., Messi E., Piccolella M., Galbiati M., Garre M., Morelli E., Vaccari T., Poletti A. // *Autophagy.* 2019. V. 15. № 4. P. 631–651.
77. Palmieri M., Pal R., Nelvagal H.R., Loffi P., Stinnett G.R., Seymour M.L., Chaudhury A., Bajaj L., Bondar V.V., Bremner L., Saleem U., Tse D.Y., Sanagasetti D., Wu S.M., Neilson J.R., Pereira F.A., Pautler R.G., Rodney G.G., Cooper J.D., Sardiello M. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 14338.
78. Cortes C.J., La Spada A.R. // *Neurobiol. Dis.* 2019. V. 122. P. 83–93.
79. Gu Z., Cao H., Zuo C., Huang Y., Miao J., Song Y., Yang Y., Zhu L., Wang F. // *Neurobiol. Dis.* 2022. V. 173. P. 105855.
80. Lu J., Wu M., Yue Z. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2020. V. 1207. P. 21–51.
81. Di Malta C., Cinque L., Settembre C. // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2019. V. 7. P. 114.
82. Benaroudj N., Lee D.H., Goldberg A.L. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 26. P. 24261–24267.

83. Beranger F., Crozet C., Goldsborough A., Lehmann S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 374. № 1. P. 44–48.
84. Gao Z., Wang H., Zhang B., Wu X., Zhang Y., Ge P., Chi G., Liang J. // *Int. J. Med. Sci.* 2018. V. 15. № 10. P. 1014–1024.
85. Darabi S., Noori-Zadeh A., Abbaszadeh H.A., Rajaei F., Bakhtiyari S. // *Iran. J. Pharm. Res.* 2019. V. 18. № 3. P. 1419–1428.
86. Tang Q., Zheng G., Feng Z., Chen Y., Lou Y., Wang C., Zhang X., Zhang Y., Xu H., Shang P., Liu H. // *Cell. Death Dis.* 2017. V. 8. № 10. P. e3081.
87. Liu K., Jing M.J., Liu C., Yan D.Y., Ma Z., Wang C., Deng Y., Liu W., Xu B. // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2019. V. 25. № 6. P. 536–547.
88. Minutoli L., Altavilla D., Bitto A., Polito F., Bellocco E., Lagana G., Fiumara T., Magazu S., Migliardo F., Venuti F.S., Squadrito F. // *Eur. J. Pharmacol.* 2008. V. 589. № 1–3. P. 272–280.
89. Echigo R., Shimohata N., Karatsu K., Yano F., Kaya-suga-Kariya Y., Fujisawa A., Ohto T., Kita Y., Nakamura M., Suzuki S., Mochizuki M., Shimizu T., Chung U.I., Sasaki N. // *J. Transl. Med.* 2012. V. 10. P. 80.
90. He Q., Wang Y., Lin W., Zhang Q., Zhao J., Liu F.T., Tang Y.L., Xiao B.G., Wang J. // *Neurotox. Res.* 2014. V. 26. № 4. P. 430–439.
91. Bussi C., Peralta Ramos J.M., Arroyo D.S., Gaviglio E.A., Gallea J.I., Wang J.M., Celej M.S., Iribarren P. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 43153.
92. Nakahira K., Haspel J.A., Rathinam V.A., Lee S.J., Dolinay T., Lam H.C., Englert J.A., Rabinovitch M., Cernadas M., Kim H.P., Fitzgerald K.A., Ryter S.W., Choi A.M. // *Nat. Immunol.* 2011. V. 12. № 3. P. 222–230.
93. Li Y., Luo Y., Luo T., Lu B., Wang C., Zhang Y., Piao M., Feng C., Ge P. // *Mol. Neurobiol.* 2017. V. 54. № 9. P. 6857–6869.
94. Uddin M.S., Mamun A.A., Labu Z.K., Hidalgo-Lanussa O., Barreto G.E., Ashraf G.M. // *J. Cell Physiol.* 2019. V. 234. № 6. P. 8094–8112.
95. Lee J.H., Cheon Y.H., Woo R.S., Song D.Y., Moon C., Baik T.K. // *Anat. Cell Biol.* 2012. V. 45. № 1. P. 26–37.
96. Khan S.H., Kumar R. // *Pathol. Res. Pract.* 2017. V. 213. № 6. P. 643–648.
97. Tien N.T., Karaca I., Tamboli I.Y., Walter J. // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. № 20. P. 10528–10540.
98. Kruger U., Wang Y., Kumar S., Mandelkew E.M. // *Neurobiol. Aging.* 2012. V. 33. № 10. P. 2291–2305.
99. Schaeffer V., Lavenir I., Ozcelik S., Tolnay M., Winkler D.T., Goedert M. // *Brain.* 2012. V. 135. Pt. 7. P. 2169–2177.
100. Ittner L.M., Ke Y.D., Delerue F., Bi M., Gladbach A., van Eersel J., Wolfing H., Chieng B.C., Christie M.J., Napier I.A., Eckert A., Staufienbiel M., Hardeman E., Gotz J. // *Cell.* 2010. V. 142. № 3. P. 387–397.
101. Perucho J., Casarejos M.J., Gomez A., Solano R.M., de Yébenes J.G., Mena M.A. // *Curr. Alzheimer Res.* 2012. V. 9. № 3. P. 334–343.
102. Lee Y.S., Lai D.M., Huang H.J., Lee-Chen G.J., Chang C.H., Hsieh-Li H.M., Lee G.C. // *J. Agric. Food Chem.* 2021. V. 69. № 8. P. 2422–2437.
103. Pupyshv A.B., Belichenko V.M., Tenditnik M.V., Bashirzade A.A., Dubrovina N.I., Ovsyukova M.V., Akopyan A.A., Fedoseeva L.A., Korolenko T.A., Ams-tislavskaya T.G., Tikhonova M.A. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2022. V. 217. P. 173406.
104. Portbury S.D., Hare D.J., Sgambelloni C., Perronnes K., Portbury A.J., Finkelstein D.I., Adlard P.A. // *J. Alzhei-mers Dis.* 2017. V. 60. № 2. P. 549–560.
105. Du J., Liang Y., Xu F., Sun B., Wang Z. // *J. Pharm. Pharmacol.* 2013. V. 65. № 12. P. 1753–1756.
106. Raza C., Anjum R., Shakeel N.U.A. // *Life Sci.* 2019. V. 226. P. 77–90.
107. Glass C.K., Saijo K., Winner B., Marchetto M.C., Gage F.H. // *Cell.* 2010. V. 140. № 6. P. 918–934.
108. Lan D.M., Liu F.T., Zhao J., Chen Y., Wu J.J., Ding Z.T., Yue Z.Y., Ren H.M., Jiang Y.P., Wang J. // *Neurochem. Res.* 2012. V. 37. P. 2025–2032.
109. Zhao J., Zhi X., Pan L., Zhou P. // *Molecules.* 2017. V. 22. № 8. P. pii: E1293.
110. Pupyshv A.B., Tikhonova M.A., Akopyan A.A., Tendit-nik M.V., Dubrovina N.I., Korolenko T.A. // *Pharma-col. Biochem. Behav.* 2019. V. 177. P. 1–11.
111. Darabi S., Noori-Zadeh A., Abbaszadeh H.A., Rajaei F., Bakhtiyari S. // *Iran. J. Pharm. Res.* 2019. V. 18. № 3. P. 1419–1428.
112. Lin C.H., Wei P.C., Chen C.M., Huang Y.T., Lin J.L., Lo Y.S., Lin J.L., Lin C.Y., Wu Y.R., Chang K.H., Lee-Chen G.J. // *Front. Aging Neurosci.* 2020. V. 12. P. 226.
113. Wu F., Xu H.D., Guan J.J., Hou Y.S., Gu J.H., Zhen X.C., Qin Z.H. // *Neuroscience.* 2015. V. 284. P. 900–911.
114. He Q., Koprach J.B., Wang Y., Yu W.B., Xiao B.G., Brochie J.M., Wang J. // *Mol. Neurobiol.* 2016. V. 53. № 4. P. 2258–2268.
115. Moors T.E., Hoozemans J.J., Ingrassia A., Beccari T., Parnetti L., Chartier-Harlin M.C., van de Berg W.D. // *Mol. Neurodegener.* 2017. V. 12. № 1. P. 11.
116. Perucho J., Gomez A., Munoz M.P., de Yébenes J.G., Mena M.A., Casarejos M.J. // *Mol. Cell. Neurosci.* 2016. V. 74. P. 128–145.
117. Yamashita S. // *J. Clin. Med.* 2021. V. 10. № 7. P. 1375.
118. Davies J.E., Berger Z., Rubinsztein D.C. // *J. Biochem. Cell Biol.* 2006. V. 38. № 9. P. 1457–1462.
119. Davies J.E., Sarkar S., Rubinsztein D.C. // *Hum. Mol. Genet.* 2006. V. 15. № 1. P. 23–31.
120. Argov Z., Vornovitsky H., Blumen S., Caraco Y. // *Neu-rology.* 2015. V. 84 (Suppl 14). P. 7.068.
121. Argov Z., Gliko-Kabir I., Brais B., Caraco Y., Megiddo D. // *Neurology.* 2016. V. 86 (Suppl 16). P. S28.004.
122. Gomes C., Escrevente C., Costa J. // *Neurosci. Lett.* 2010. V. 475. № 3. P. 145–149.
123. Li Y., Guo Y., Wang X., Yu X., Duan W., Hong K., Wang J., Han H., Li C. // *Neuroscience.* 2015. V. 298. P. 12–25.
124. Zhang X., Chen S., Song L., Tang Y., Shen Y., Jia L., Le W. // *Autophagy.* 2014. V. 10. № 4. P. 588–602.
125. Sahoo A.K., Dandapat J., Dash U.C., Kanhar S. // *J. Ethnopharmacol.* 2018. V. 215. P. 42–73.

126. Halbe L., Rami A. // *Curr. Neurovasc. Res.* 2019. V. 16. № 1. P. 3–11.
127. Schmeisser K., Parker J.A. // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2019. V. 7. P. 192.
128. Cejka C., Kubinova S., Cejkova J. // *Histol. Histo-pathol.* 2019. V. 34. № 6. P. 611–618.
129. Kaplon R.E., Hill S.D., Bispham N.Z., Santos-Parker J.R., Nowlan M.J., Snyder L.L., Chonchol M., LaRocca T.J., McQueen M.B., Seals D.R. // *Aging.* 2016. V. 8. № 6. P. 1167–1183.
130. Noorasyikin M.A., Azizan E.A., Teh P.C., Farah Waheeda T., Siti Hajar M.D., Long K.C., Norlinah M.I. // *Park. Relat. Disord.* 2020. V. 70. P. 42–44.
131. Yap K.H., Azmin S., Makpol S., Damanhuri H.A., Mustapha M., Hamzah J.C., Ibrahim N.M. // *Neural Regen. Res.* 2023. V. 18. № 6. P. 1179–1185.
132. Assoni G., Frapporti G., Colombo E., Gornati D., Perez-Carrion M.D., Polito L., Seneci P., Piccoli G., Arosio D. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2021. V. 40. P. 127929.
133. Frapporti G., Colombo E., Ahmed H., Assoni G., Polito L., Randazzo P., Arosio D., Seneci P., Piccoli G. // *Pharmaceutics.* 2022. V. 14. № 4. P. 862.
134. Zhang Y., Shaikh N., Ferey J.L., Wankhade U.D., Chintapalli S.V., Higgins C.B., Crowley J.R., Heitmeier M.R., Stothard A.I., Mihi B., Good M., Higashiyama T., Swarts B.M., Hruz P.W., Shankar K., Tarr P.I., DeBosch B.J. // *Gastroenterology.* 2020. V. 158. № 5. P. 1402–1416.

Multiple Mechanisms of the Therapeutic Effect of Trehalose in Inhibition of Experimental Neurodegeneration

A. B. Pupyshev^a, T. A. Korolenko^a, and M. A. Tikhonova^a

^a*Scientific Research Institute of Neurosciences and Medicine, Novosibirsk, Russia*

The search for effective treatment for neurodegeneration implies attacking the multiple mechanisms of this pathology. Such properties were found in disaccharide trehalose, which shows therapeutic effects in models of many diseases and has been approved by the FDA for use in humans. Trehalose consists of two glucose residues bonded together by a flexible α -1-1'-glycosidic bond, giving it chaperone-like activity. Due to this, it prevents abnormal folding of aberrant proteins and has the properties of a cryo- and bioprotector. However, the main therapeutic effect is determined by the induction of mTOR-independent autophagy mediated by AMPK kinase as the main target. The result is a weakening of the accumulation of cytotoxic proteins and factors and an increase in cell viability. Autophagy activation depends on trehalose-induced lysosome and autophagosome biogenesis through activation of transcription factors TFEB and FOXO1. Trehalose has an anti-inflammatory effect closely related to the inhibition of oxidative stress. Trehalose-induced enhancement of endogenous antioxidant defense involves the regulator Nrf2. The review considers the neuroprotective effects of trehalose in models of major neurodegenerative diseases such as Parkinson's, Alzheimer's, Huntington's and others. Overall, trehalose shows high therapeutic potential in the treatment of experimental neurodegeneration and thus stimulating the study of its clinical application.

Keywords: neurodegeneration, neuroprotection, α -synuclein, amyloid- β , tau, trehalose, autophagy, mTOR-independent, GLUT8, AMPK, TFEB, Nrf2, neuroinflammation, oxidative stress, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, Huntington's disease, amyotrophic lateral sclerosis, oculopharyngeal muscular dystrophy

УДК 616.8-005

РОЛЬ VEGF В АНГИОГЕНЕЗЕ И МОТОРНОМ ВОССТАНОВЛЕНИИ ПОСЛЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

© 2023 г. К. С. Кучерова¹ *, Е. С. Королёва¹, В. М. Алифирова¹¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет», Томск, Россия

Поступила в редакцию 26.02.2023 г.

После доработки 03.04.2023 г.

Принята к публикации 04.04.2023 г.

Научные исследования последних лет свидетельствуют о том, что ангиогенез и нейрогенез являются взаимосвязанными процессами, обуславливающими функциональный исход после ишемического инсульта. В данном обзоре литературы приведены современные данные о нейрососудистых взаимодействиях при ишемическом инсульте, описана роль семейства факторов роста эндотелия сосудов в регуляции ангио- и нейрогенеза, имеющих ведущее значение в нейронном выживании и нейропластичности. Авторами проведен поиск литературы о патофизиологической роли VEGF при острой ишемии головного мозга с использованием соответствующих ключевых слов в поисковых системах PubMed и Google Scholar, по базам данных Scopus, Web of Science, MedLine, The Cochrane Library, EMBASE, Global Health, CyberLeninka, eLibrary и др. Клинические исследования, посвященные оценке роли VEGF при ишемическом инсульте, в большинстве случаев основаны на животных моделях, и их результаты являются неоднозначными, что, определяется многогранностью его действия. VEGF является важным регулятором ангиогенеза, нейропротекции и нейрогенеза, однако доказано и его негативное влияние в виде увеличения проницаемости ГЭБ и как следствие отеку головного мозга, а также активации воспалительных процессов. Таким образом, необходимо дальнейшее изучение VEGF для определения его роли в функциональном восстановлении после ишемического инсульта.

Ключевые слова: ишемический инсульт, фактор роста эндотелия сосудов, ангиогенез, нейрогенез

DOI: 10.31857/S1027813323040143, EDN: OPSDJV

ВВЕДЕНИЕ

Инсульт – одна из ведущих медико-социальных проблем современной медицины, которая наносит огромный ежегодный экономический ущерб и является одной из основных причин смертности и инвалидизации среди населения трудоспособного возраста во всем мире [1, 2]. По данным отчета The 2016 Global Burden of Disease, опубликованном в 2019 г., каждый четвертый человек перенесет инсульт в течение жизни. Ежегодно в мире прогнозируется развитие 9.6 млн инсультов с ростом заболеваемости по мере старения населения, при этом 85% случаев приходится на долю ишемического инсульта [3].

Ишемический инсульт, на долю которого приходится 87% всех случаев инсульта, возникает в результате внезапного прекращения адекватного кровоснабжения головного мозга, что приводит к серии патофизиологических явлений в нервной ткани, таким как эксайтотоксичность, окислительный стресс, повышенная проницаемость ге-

матоэнцефалического барьера (ГЭБ) и воспаление, которые в конечном итоге приводят к гибели нервных клеток. Функциональный исход после ишемического инсульта зависит от судьбы ишемической полутени, если кровообращение будет восстановлено вовремя. Степень некроза нейронов пропорциональна уровню нарушения перфузии, поэтому ранняя реперфузия необходима для предотвращения обширного повреждения нервной системы [4].

Известно, что моторное восстановление после ишемического инсульта, сопровождающегося тяжелым неврологическим дефицитом, очень затруднено [5]. Ряд исследователей пытались расшифровать клеточные и молекулярные механизмы преодоления ограниченной способности восстановления нервной ткани, которые приводят к восстановлению утраченных функций после инсульта [6]. Одним из основных аспектов, связанных с плохой регенерацией нейронов и глии, является неспособность окружающей среды поддерживать рост аксонов и их миелинизацию [7]. Нейро-васкулярные элементы могут усилить репарацию, а затем поддерживать рост аксонов за

* Адресат для корреспонденции: 634055, Томск, Московский тракт, д. 2; e-mail: kristyajka@ya.ru.

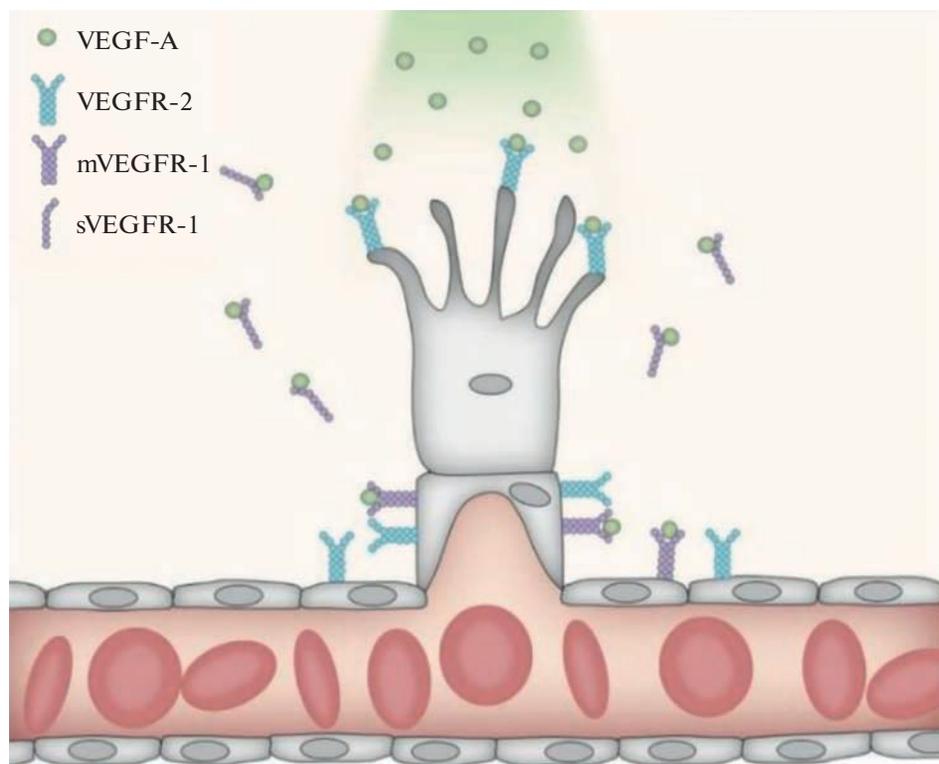


Рис. 1. Ключевые механизмы ангиогенеза, опосредованные VEGF-A.

счет усиления эндогенного ангиогенеза, глиогенеза, нейрогенеза и образования новых синаптических связей [8].

Факторы роста являются важными регуляторами защиты и восстановления после ишемии, а комбинированное действие факторов роста регулирует ангиогенез, нейропротекцию, нейрогенез, а также миграцию нейрональных стволовых клеток в зону ишемии и их пролиферацию в функциональные нейроны. Одним важным семейством факторов роста является семейство факторов роста эндотелия сосудов (Vascular endothelial growth factor, VEGF) [9–13].

Семейство VEGF представлено пятью подтипами: VEGF-A, -B, -C, -D и плацентарного фактора роста (PlGF). Из них наибольшее внимание привлечено VEGF-A (рис. 1). VEGF-A оказывает проангиогенное и нейропротекторное действие, а также индуцирует нейрогенез [14].

Высокая экспрессия VEGF способствует перфузии крови в очаге ишемии, что обуславливает нейрогенез и нейропротекцию [15]. Уровень VEGF тесно связан со степенью тяжести инсульта; однако эта корреляция до сих пор вызывает споры. Исследование Matsuo et al., 2013 показало, что при всех подтипах инсульта уровень VEGF в плазме повышался в острейшем периоде инсульта, тогда как другое исследование (Lee, 2010) показало, что повышение уровня VEGF связано с

улучшением восстановления после инсульта после острой фазы ишемии, что вероятно связано с плейотропностью его действия. Во-первых, VEGF стимулирует пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, приводя к образованию новых сосудов. Это приводит к более эффективной сети коллатералей, которые могут обойти окклюзированный сосуд и тем самым спасти полутень. Однако VEGF-A также увеличивает проницаемость сосудов [16]. Последний эффект может вызвать отек мозга и повышение внутричерепного давления, что губительно в острой фазе инсульта. Повышенная проницаемость сосудов также позволяет проникать молекулам и иммунным клеткам, которые в норме блокируются гематоэнцефалическим барьером (ГЭБ), вызывая нейровоспаление [17].

Роль VEGF при ишемическом инсульте

Патофизиологическая роль VEGF при ишемическом инсульте. В ответ на ишемию VEGF-A, а также его рецепторы VEGFR-1 и VEGFR-2 активируются [18]. Увеличение концентрации нейропептида происходит преимущественно в области ишемической полутени. Однако также сообщалось об увеличении концентрации нейробелка в областях коры, которые функционально связаны с областью инфаркта [19]. При инсульте уровень

VEGF-A повышается в астроцитах, нейронах и эндотелиальных клетках, а также в полутени по сравнению как с областью инфаркта, так и с контралатеральным полушарием [20]. Что касается самого VEGF-A, экспрессия VEGFR-2 в сосудистой сети увеличивается в полутени по сравнению с контралатеральным полушарием. Сообщалось об увеличении VEGFR-1 в полутени, но также и в мягкой мозговой оболочке, а также в сосудах, в ядре зоны инсульта. В полутени активация VEGFR-1 была почти исключительно в реактивных астроцитах и в прорастающих сосудах [21]. Сообщается, что увеличение VEGF-A и VEGF-рецепторов начинается уже через 2–4 ч после начала инсульта и продолжается не менее 28 дней [22]. Увеличение начинается позже в астроцитах, чем в нейронах [23]. По словам Zan L. et al. [24], увеличение VEGF-A в ответ на ишемию является двухфазным. Авторы сообщили о первом пике VEGF-A через 6 ч после реперфузии, который нормализовался в течение 12 ч, а затем снова достиг максимума через семь дней после реперфузии. Сообщалось, что уровни VEGF-A возвращались к исходному уровню через две недели.

Текущее состояние знаний о роли VEGF-A при инсульте почти исключительно основано на моделях на животных. VEGF-A обладает множественными защитными эффектами, включая стимулирование ангиогенеза, нейрогенеза и нейропротекции, что приводит к улучшению функционального восстановления [25].

Ангиогенез. Усиление ангиогенеза очень важно для нейропротекторных эффектов VEGF при инсульте, а активация VEGF-A и VEGFR-2 в полутени прямо коррелирует с невровазкуляризацией [20, 22, 27]]. В здоровом головном мозге крысы введение VEGF-A вызывает активацию VEGFR-1 и VEGFR-2 и значительное увеличение васкуляризации головного мозга [28]. Кроме того, было показано, что трансплантация стволовых клеток, которые сверхэкспрессируют VEGF-A, вызывает ангиогенез нервной ткани реципиента [29]. VEGF-A регулирует ангиогенез в головном мозге за счет комбинированного действия VEGFR-1 и VEGFR-2, при этом активация последнего увеличивает ангиогенез, а активация первого снижает его. Вместе эти рецепторы обеспечивают тщательно регулируемый процесс образования новых сосудов в головном мозге. Когда VEGF-A связывается с VEGFR-2, активируется фосфоинозитид-3-киназа (PI3K); эта киназа является центральным компонентом ангиогенного процесса. PI3K активирует киназу B (Akt), которая способствует миграции эндотелиальных клеток ГЭБ [30]. В одном из исследований [31] было показано, что CRISPR/Cas9-опосредованное истощение VEGFR-2 полностью блокирует VEGF-индуцированное фосфорилирование Akt в эндотелиальных клетках микрососудов сетчатки человека.

Следовательно, ингибируется пролиферация, миграция и образование трубочек этих клеток *in vitro*. Это демонстрирует зависимость ангиогенеза от пути VEGFR-2-PI3K-Akt.

Дальнейшие механизмы фосфорилированного Akt (pAkt) включают активацию синтазы оксида азота (NOS). Этот фермент катализирует превращение аминокислоты L-аргинина в оксид азота (NO). Описаны четыре изоформы NOS: эндотелиальная NOS (eNOS), индуцируемая NOS (iNOS), нейрональная NOS (nNOS) и митохондриальная NOS (mtNOS) [32]. В то время как роль VEGFR-2 в ангиогенезе хорошо описана, подробный механизм, участвующий в передаче сигналов VEGFR-1, менее известен. Снижение VEGFR-2-опосредованных путей, по-видимому, является важным эффектом; альтернативный сплайсинг VEGFR-1 приводит к мембраносвязанной форме и растворимой форме. Последний секретируется эндотелиальными клетками и может модулировать количество VEGF-A, доступного для связывания с VEGFR-2. Кроме того, VEGFR-1 в мембране эндотелиальных клеток противодействует ангиогенной функции VEGFR-2 на тех же клетках, и активация VEGFR-1 тем самым ограничивает рост сосудов. VEGFR-1 на эндотелиальных клетках связывает VEGF-A с высокой аффинностью, но проявляет низкую киназную активность. На самом деле, удаление киназного домена без воздействия на лиганд-связывающую область не приводит к выявляемым аномалиям в плотности кровеносных сосудов. Однако генетическая делеция VEGFR-1 приводила к избыточному росту сосудов и образованию дисфункциональных сосудов. Мыши с заблокированным VEGFR-1 умирали в начале эмбрионального периода, подчеркивая важность VEGFR-1 в дополнение к VEGFR-2 для надлежащей васкуляризации. В то время как секретируемая изоформа VEGFR-1, а не мембраносвязанная изоформа, регулирует ветвление сосудов, обе изоформы регулируют митотические свойства эндотелиальных клеток. Таким образом, в настоящее время считается, что секретируемый VEGFR-1 инактивирует VEGF-A на обеих сторонах нового сосуда, тем самым обеспечивая путь более высокой концентрации VEGF-A, который направляет прорастающие сосуды в правильном направлении [33].

Интересно, что VEGF-опосредованный ангиогенез, по-видимому, не ограничивается областью ишемии, поскольку увеличение VEGF-A и соответствующая васкуляризация наблюдались даже в противоположном полушарии. На самом деле Y. Wang, 2005, обнаружили, что VEGF-A-индуцированный ангиогенез может приводить к феномену гемодинамического обкрадывания, при котором кровотоки снижаются в областях ишемии, но увеличивается в областях вне очага поражения. Они предполагают, что VEGF-A защищает ней-

роны от ишемической гибели клеток за счет прямого действия на нейроны, а не только путем стимуляции ангиогенеза.

Вазодилатация. Было показано, что за пределами центральной нервной системы (ЦНС) VEGF-A оказывает сосудорасширяющее действие, увеличивая кровоток при экспрессии в условиях ишемии. Например, в модели ишемии конечности у кроликов было показано, что совместное применение VEGF-A с серотонином в подвздошной артерии увеличивало кровоток более чем на 100% [34]. В изолированных коронарных артериях VEGF-A приводит к медленному повышению уровня цитозольного кальция в эндотелиальных клетках и эндотелий-зависимому расслаблению артерий [35]. Как описано выше, VEGF может активировать путь VEGFR-2-PI3K-Akt-eNOS, чтобы индуцировать ангиогенез. Однако тот же путь опосредует и другие эффекты на сосуды. Например, eNOS отвечает за расширение сосудов после гипоксии/ишемии, что приводит к увеличению мозгового кровотока. Считается, что этот эффект опосредован циклическим гуанозинмонофосфатом (цГМФ), который высвобождается из эндотелиальных клеток и вызывает расслабление соседних гладкомышечных клеток. Кроме того, систематический обзор эффектов NO на моделях инсульта у животных [36] показал, что NO улучшает мозговой кровоток и уменьшает объем инфаркта. Дальнейшая демонстрация взаимосвязи между eNOS и прогрессированием инсульта у мышей с блокированием eNOS показала снижение мозгового кровотока и развитие более крупных церебральных инфарктов, чем у мышей с функционирующим ферментом [37]. Кроме того, в течение первых 30 мин после окклюзии средней мозговой артерии (СМА) у крыс введение предшественника NO L-аргинина или нитропруссидна натрия (SNP) и 3-морфолиносидномина улучшали мозговой кровоток и предотвращали некроз тканей [38].

Сосудистая проницаемость. Повышение проницаемости сосудов является одним из ранних явлений при инсульте. Известно, что негерметичные кровеносные сосуды приводят к отеку, который, в свою очередь, затрудняет перфузию и, следовательно, приводит к более значительной гибели нейронов. Этот эффект в значительной степени опосредован действием VEGF-A-VEGFR-2 и пути Src, хотя активация пути PI3K-Akt-eNOS также играет роль в повышенной проницаемости ГЭБ, наблюдаемой при остром инсульте [4]. Семейство киназ Src состоит из протоонкогенных нерецепторных тирозинкиназ. Активация Src регулируется рядом различных сигналов, включая действие рецептора VEGF-A. Увеличение фосфорилирования Src во время острой фазы ишемии связано с VEGF-индуцированной проницаемостью сосудов. Затем активация Src возвращается

к исходному уровню в течение первого дня, прежде чем произойдет второе повышение через 3–7 дней после реперфузии [24]. Связь пути Src с VEGF-A, по-видимому, двунаправленная: в условиях ишемии; Src может регулировать экспрессию VEGF-A, поскольку ингибирование Src снижает уровни VEGF-A и, следовательно, уменьшается VEGF-A-индуцированная сосудистая проницаемость. В результате уменьшается отек головного мозга и уменьшается объем поражения [39]. С другой стороны, мыши с заблокированным Src, устойчивы к VEGF-индуцированной вазопроницаемости и отеку [40].

В контексте опосредованного VEGF-A нарушения ГЭБ на ранних стадиях инсульта важным фактором может быть воспаление. Нейровоспалительная реакция после инсульта способствует повреждению нейронов, но также играет важную роль в нейрогенезе, как описано в обзоре Tobin M.K., Bonds J.A. et al., 2014. VEGF-A, вероятно, активируется в ответ на воспалительные цитокины в ЦНС [41]. Однако, необходимы дополнительные исследования, чтобы выяснить прямое участие VEGF-A в нейровоспалении после инсульта.

Нейропротекция. Несмотря на название, VEGF-A действует не только на эндотелий сосудов. Вместо этого VEGF-A действует на несколько других типов клеток, включая нейроны, что было продемонстрировано в многочисленных исследованиях [42–44]. VEGF-A способствует выживанию нейронов в моделях инсульта на клеточных культурах, включая модель депривации кислорода и глюкозы [45] и модель эксайтотоксичности [46]. Большинство этих прямых эффектов VEGF-A на нейроны приписывают активации пути PI3K-Akt, описанного выше, и каскада митоген-активируемых протеинкиназ (MAPK). *In vivo* нейропротекторные эффекты VEGF-A также были продемонстрированы на моделях инсульта в бассейне средней мозговой артерии. Локальное нанесение VEGF-A на поверхность реперфузированного мозга уменьшало объем инфаркта у крыс [47]. Кроме того, демонстрируя защитный эффект VEGF-A, внутрижелудочковая инфузия антитела против VEGF-A приводила к увеличению объема поражения [48]. Из исследований *in vivo* невозможно отличить прямое действие VEGF-A на нейрональные VEGFR от косвенных эффектов, опосредованных эндотелиальными VEGFR.

Нейрогенез. Нейрогенез у взрослого человека происходит в двух отделах: субвентрикулярной зоне боковых желудочков и субгранулярной зоне зубчатой извилины. Хотя недавнее исследование [49] поставило под сомнение концепцию взрослого нейрогенеза в субгранулярной зоне человека, большинство исследований показывают, что обе ниши являются источниками нейрогенеза

на протяжении всей взрослой жизни [50–52]. Церебральная ишемия стимулирует нейрогенез в обеих этих областях [53]. Повышенный уровень VEGF-A, вероятно, является важным стимулятором, поскольку повышенный уровень VEGF-A сам по себе индуцирует нейрогенез в обеих этих областях [54]. У трансгенных мышей со сверхэкспрессией VEGF-A повышается не только нейрогенез, но и миграция новообразованных нейронов в периинфарктную кору [55]. Это говорит о том, что VEGF-A-индуцированный нейрогенез может замещать некоторые нейроны, погибшие во время инсульта. Многие сообщения о нейрогенезе описывают повышенные уровни маркера нейральной пролиферации BrdU и маркера незрелых нейронов даблкортина в зубчатой извилине гиппокампа в результате увеличения VEGF. Нейральные стволовые клетки и клетки-предшественники гиппокампа (NSPC) могут даже продуцировать VEGF-A для поддержания пула NSPC в субгранулярной зоне [56].

VEGFR-2 является основным рецептором VEGF-A, участвующим в нейрогенезе. После церебральной ишемии нейробласты, экспрессирующие VEGFR-2, мигрируют по сосудам в области ишемии. Более того, блокирование VEGFR-2 снижало нейрогенез в модели инсульта у животных [57]. VEGF-A стимулировал размножение нейральных стволовых клеток, тогда как блокирование активности VEGFR-2 снижало размножение нейральных стволовых клеток. Увеличение количества мигрирующих и развивающихся нейронов в полутени коррелирует с VEGF-A и VEGFR-2. VEGF-A совместно локализуется с фактором репарации ДНК ERCC6 в нейронах, но не в астроцитах после инсульта в СМА, предполагая прямую роль в восстановлении нейронов. Ингибирование астроцитов флуороцитратом снижает VEGF-A-опосредованное увеличение маркеров пролиферации нейронов в новообразованных нейронах после окклюзии СМА, что свидетельствует о том, что VEGF-опосредованное увеличение новообразованных нейронов вызвано трансдифференцировкой астроцитов в нейроны [58].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на ряд публикаций, посвященных клиническому применению VEGF в качестве биомаркера прогрессирования после церебрального инсульта, результаты исследований довольно неоднозначны. В одних исследованиях подтверждено увеличение концентрации VEGF-A в сыворотке крови после инсульта [59], однако в мета-анализе Ali Seidkhani-Nahal et al., 2021 было показано, что уровень этого белка статистически значимо не меняется у больных инсультом по сравнению с контрольной выборкой [60]. Также еще предстоит выяснить, как VEGF-A коррели-

руют с его тяжестью. Одно исследование показало, что повышенный уровень VEGF-A можно использовать в качестве предиктора улучшения восстановления после инсульта [61]. Другое исследование, показало, что уровни VEGF-A положительно коррелируют с тяжестью инсульта при кардиоэмболическом подтипе инсульта, в то время как отрицательная корреляция с неврологической тяжестью была обнаружена при атеротромботическом инфаркте головного мозга [59]. Таким образом, текущие данные затрудняют определение того, в каких условиях применение VEGF-A как биомаркера функционального исхода будет наиболее информативно.

Проблема использования VEGF-A в клинических испытаниях, также заключается в разнонаправленном действии VEGF-A, описанном выше. С одной стороны, VEGF-A является ключевым регулятором ангиогенеза, нейропротекции и нейрогенеза. Однако во время острой фазы повышенный уровень VEGF-A вызывает разрушение ГЭБ, что приводит к нарушению гомеостаза и отеку головного мозга. Эти вредные эффекты VEGF-A на целостность сосудов являются преходящими, так как увеличение VEGF-A после острой фазы оказывает нейропротекторное действие.

Также, прежде чем использовать VEGF-A в клинических условиях, необходимо определить временное окно, когда его применение будет наиболее чувствительно, специфично и точно. Таким образом, применение VEGF-A как предиктора исхода ишемического инсульта является актуальной темой исследования и требует дополнительной работы в данном направлении.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии внешних источников финансирования при проведении исследования.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скворцова В.И., Шетова И.М., Какорина Е.П., Камкин Е.Г., Бойко Е.Л., Алекян Б.Г., Иванова Г.Е., Шамалов Н.А., Дашьян В.Г., Крылов В.В. // Профилактическая медицина. 2018. Т. 21. № 1. С. 4–10.
2. Khatib R., Arevalo Y.A., Berendsen M.A., Prabhakaran S., Huffman M.D. // *Neuroepidemiology*. 2018. V. 51. P. 104–112.
3. GBD 2016 Stroke Collaborators. Global, regional, and national burden of stroke, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 // *Lancet Neurol*. 2019. V. 18. P. 439–458.

4. Moon S., Chang M.S., Koh S.H., Choi Y.K. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 8543.
5. Schwab M.E., Strittmatter S.M. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2014. V. 27. P. 53–60.
6. Mahar M., Cavalli V. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2018. V. 19. P. 323–337.
7. Tedeschi A., Bradke F. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2017. V. 42. P. 118–127.
8. Jung E., Koh S.H., Yoo M., Choi Y.K. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 2273.
9. Namiecinska M., Marciniak K., Nowak J.Z. // *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2005. V. 59. P. 573–583.
10. Gora-Kupilas K., Josko J. // *Folia Neuropathol.* 2005. V. 43. P. 31–39.
11. Cao L., Jiao X., Zuzga D.S., Liu Y., Fong D.M., Young D., During M.J. // *Nat. Genet.* 2004. V. 36. P. 827–835.
12. Dziejko M., Derugin N., Wendland M.F., Vexler Z.S., Ferriero D.M. // *Transl. Stroke Res.* 2013. V. 4. P. 189–200.
13. Nishijima K., Ng Y.-S., Zhong L., Bradley J., Schubert W., Jo N., Akita J., Samuelsson S.J., Robinson G.S., Adamis A.P. // *Am. J. Pathol.* 2007. V. 171. P. 53–67.
14. Ma Y., Zechariah A., Qu Y., Hermann D.M. // *J. Neurosci. Res.* 2012. V. 90. P. 1873–1882.
15. He Y.Z., Lin B. // *J. Clin. Orthopaed.* 2012. V. 15. P. 569–573.
16. Weis S.M., Cheresch D.A. // *Nature.* 2005. V. 437. P. 497–504.
17. Zhang H.T., Zhang P., Jiang C.L., Li Y.L. // *Chin. J. Diff. Complic. Cases.* 2015. V. 14. P. 756–758.
18. Marti H.J., Bernaudin M., Bellail A., Schoch H., Euler M., Petit E., Risau W. // *Am. J. Pathol.* 2000. V. 156. P. 965–976.
19. Stowe A.M., Plautz E.J., Nguyen P., Frost S.B., Eisner-Janowicz I., Barbay S., Dancause N., Sensarma A., Taylor M.D., Zoubina E.V. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2008. V. 28. P. 612–620.
20. Guan W., Somanath P.R., Kozak A., Goc A., El-Remessy A.B., Ergul A., Johnson M.H., Alhusban A., Soliman S., Fagan S.C. // *PLoS ONE.* 2011. V. 6. P. 24551.
21. Krum J.M., Khaibullina A. // *Exp. Neurol.* 2003. V. 181. P. 241–257.
22. Zhang Z.G., Zhang L., Tsang W., Soltanian-Zadeh H., Morris D., Zhang R., Goussev A., Powers C., Yeich T., Chopp M. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002. V. 22. P. 379–392.
23. Lee M.Y., Ju W.K., Cha J.H., Son B.C., Chun M.H., Kang J.K., Park C.K. // *Neurosci. Lett.* 1999. V. 265. P. 107–110.
24. Zan L., Zhang X., Xi Y., Wu H., Song Y., Teng G., Li H., Qi J., Wang J. // *Neuroscience.* 2014. V. 262. P. 118–128.
25. Thau-Zuchman O., Shohami E., Alexandrovich A.G., Leker R.R. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2010. V. 30. P. 1008–1016.
26. Manoonkitiwongsa P.S. // *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 2011. V. 10. P. 215–234.
27. Chen J., Zhang C., Jiang H., Li Y., Zhang L., Robin A., Katakowski M., Lu M., Chopp M. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2005. V. 25. P. 281–290.
28. Krum J.M., Mani N., Rosenstein J.M. // *Neuroscience.* 2002. V. 110. P. 589–604.
29. Lee H.J., Kim K.S., Park I.H., Kim S.U. // *PLoS ONE.* 2007. V. 2. S. 156.
30. Ruan G.X., Kazlauskas A. // *EMBO J.* 2012. V. 31. P. 1692–1703.
31. Wu W., Duan Y., Ma G., Zhou G., Park-Windhol C., D'Amore P.A., Lei H. // *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2017. V. 58. P. 6082–6090.
32. Guix F.X., Uribealago I., Coma M., Munoz F.J. // *Prog. Neurobiol.* 2005. V. 76. P. 126–152.
33. Geiseler S.J., Morland C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. P. 1362.
34. Bauters C., Asahara T., Zheng L.P., Takeshita S., Bunting S., Ferrara N., Symes J.F., Isner J.M. // *Circulation.* 1995. V. 91. P. 2802–2809.
35. Ku D.D., Zaleski J.K., Liu S., Brock T.A. // *Am. J. Physiol.* 1993. V. 265. P. 586–592.
36. Willmot M., Gray L., Gibson C., Murphy S., Bath P.M. // *Nitric Oxide.* 2005. V. 12. P. 141–149.
37. Huang Z., Huang P.L., Ma J., Meng W., Ayata C., Fishman M.C., Moskowitz M.A. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1996. V. 16. P. 981–987.
38. Salom J.B., Orti M., Centeno J.M., Torregrosa G., Alborch E. // *Brain Res.* 2000. V. 865. P. 149–156.
39. Lee S.W., Kim W.J., Choi Y.K., Song H.S., Son M.J., Gelman I.H., Kim Y.J., Kim K.W. // *Nat. Med.* 2003. V. 9. P. 900–906.
40. Bella A.J., Lin G., Tantiwongse K., Garcia M., Lin C.S., Brant W., Lue T.F. // *Part I. J. Sex. Med.* 2006. V. 3. P. 815–820.
41. You T., Bi Y., Li J., Zhang M., Chen X., Zhang K., Li J. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 41779.
42. Greenberg D.A., Jin K. // *Nature.* 2005. V. 438. P. 954–959.
43. Rosenstein J.M., Mani N., Khaibullina A., Krum J.M. // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. P. 11036–11044.
44. Jin K., Mao X.O., Greenberg D.A. // *J. Neurobiol.* 2006. V. 66. P. 236–242.
45. Jin K.L., Mao X.O., Greenberg D.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2000. V. 97. P. 10242–10247.
46. Svensson B., Peters M., Konig H.G., Poppe M., Levkau B., Rothermundt M., Arolt V., Kogel D., Prehn J.H. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002. V. 22. P. 1170–1175.
47. Hayashi T., Abe K., Itoyama Y. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1998. V. 18. P. 887–895.
48. Bao W.L., Lu S.D., Wang H., Sun F.Y. // *Zhongguo Yao Li Xue Bao.* 1999. V. 20. P. 313–318.
49. Sorrells S.F., Paredes M.F., Cebrian-Silla A., Sandoval K., Qi D., Kelley K.W., James D., Mayer S., Chang J., Augustine K.I. // *Nature.* 2018. V. 555. P. 377–381.
50. Ming G.-L., Song H. // *Neuron.* 2011. V. 70. P. 687–702.
51. Ernst A., Frisén J. // *PLoS Biol.* 2015. V. 13. e1002045.
52. Gage F.H. // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. P. 612–613.

53. Jin K., Wang X., Xie L., Mao X.O., Zhu W., Wang Y., Shen J., Mao Y., Banwait S., Greenberg D.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. P. 13198–13202.
54. Wang Y.Q., Cui H.R., Yang S.Z., Sun H.P., Qiu M.H., Feng X.Y., Sun F.Y. // Neurochem. Int. 2009. V. 55. P. 629–636.
55. Wang Y., Jin K., Mao X.O., Xie L., Banwait S., Marti H.H., Greenberg D.A. // J. Neurosci. Res. 2007. V. 85. P. 740–747.
56. Kirby E.D., Kuwahara A.A., Messer R.L., Wyss-Coray T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. P. 4128–4133.
57. Li W.-L., Fraser J.L., Yu S.P., Zhu J., Jiang Y.-J., Wei L. // Exp. Brain Res. 2011. V. 214. P. 503.
58. Schanzer A., Wachs F.P., Wilhelm D., Acker T., Cooper-Kuhn C., Beck H., Winkler J., Aigner L., Plate K.H., Kuhn H.G. // Brain Pathol. 2004. V. 14. P. 237–248.
59. Matsuo R., Ago T., Kamouchi M., Kuroda J., Kuwashiro T., Hata J., Sugimori H., Fukuda K., Gotoh S., Makihara N. // BMC Neurol. 2013. V. 13. P. 32.
60. Seidkhani-Nahal A., Khosravi A., Mirzaei A. // Neurol. Sci. 2021. P. 1811–1820.
61. Lee S.C., Lee K.Y., Kim Y.J., Kim S.H., Koh S.H., Lee Y.J. // Eur. J. Neurol. 2010. V. 17(1). P. 45–51.

Role of VEGF in Angiogenesis and Motor Recovery after Ischemic Stroke

K. S. Kucherova^a, E. S. Koroleva^a, and V. M. Alifirova^a

^a*Siberian State Medical University, Tomsk, Russia*

Recent scientific studies indicate that angiogenesis and neurogenesis are interrelated processes that determine the functional outcome after ischemic stroke. This literature review presents current data on neurovascular interactions in ischemic stroke, describes the role of the family of vascular endothelial growth factors in the regulation of angiogenesis and neurogenesis, which play a leading role in neuronal survival and neuroplasticity. The authors searched the literature on the pathophysiological role of VEGF in acute cerebral ischemia using the relevant keywords into the PubMed and Google Scholar search engines, as well as Scopus, Web of Science, MedLine, The Cochrane Library, EMBASE, Global Health, CyberLeninka, eLibrary, and other databases. Clinical studies evaluating the role of VEGF in ischemic stroke are in most cases based on animal models, and their results are ambiguous, which is determined by the versatility of its action. VEGF is an important regulator of angiogenesis, neuroprotection and neurogenesis, but its negative effect has also been proven in the form of an increase in the permeability of the BBB and, as a consequence, cerebral edema, as well as the activation of inflammatory processes. Thus, further study of VEGF is needed to determine its role in functional recovery after ischemic stroke.

Keywords: ischaemic stroke, vascular endothelial growth factor, angiogenesis, neurogenesis

**ЦЕНТРАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПЕРИФЕРИЧЕСКИ
ВВЕДЕННЫХ ИММУННЫХ КЛЕТОК, МОДУЛИРОВАННЫХ
ОРИГИНАЛЬНЫМ АНТИКОНВУЛЬСАНТОМ,
ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АЛКОГОЛИЗМЕ**

© 2023 г. Е. В. Маркова¹, *, И. В. Савкин¹, Е. В. Серенко¹, М. А. Княжева¹, Ю. А. Шевченко¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной
и клинической иммунологии», Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 15.02.2023 г.

После доработки 18.03.2023 г.

Принята к публикации 31.03.2023 г.

Нарушение нейроиммунных регуляторных связей, обусловленное, в частности, изменением функционального фенотипа иммунокомпетентных клеток вследствие хронической интоксикации этанолом является существенным звеном в патогенезе алкоголизма. Однонаправленное влияние большинства психоактивных препаратов на клетки нервной и иммунной систем позволяет рассматривать иммунокомпетентные клетки в качестве модельных объектов для воздействия на межсистемную функциональную взаимосвязь. На основании собственных приоритетных данных о наличии иммуномодулирующих свойств при хронической алкогольной интоксикации у оригинального антиконвульсанта, действующего на молекулярные мишени влияния этанола в ЦНС и иммунной системе, целью проведенного исследования было оценить центральные эффекты периферически введенных лимфоцитов с модулированной *in vitro* функциональной активностью синтетическим лигандом ГАМКА-рецепторного комплекса *meta*-хлорбензгидрилмочевинной у длительно алкоголизованных животных. В результате проведенных исследований установлено, что трансплантацией прекультивированных с указанным антиконвульсантом лимфоцитов у сингенных длительно алкоголизованных реципиентов достигается снижение алкогольной мотивации и стимуляция поведенческой активности в тесте «Открытое поле». Регистрация характерных для хронической алкогольной интоксикации паттернов поведения регистрировалась на фоне снижения в патогенетически значимых структурах мозга провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ФНО- α , ИФН- γ и повышения противовоспалительного цитокина ИЛ-10, равно как и повышения уровня BDNF в гиппокампе, что позволяет рассматривать снижение нейровоспаления и стимуляцию нейропластичности в качестве возможных механизмов редактирования поведения реципиентов. Визуализация функционально активных лимфоцитов, прекультивированных с *meta*-хлорбензгидрилмочевинной в паренхиме головного мозга длительно алкоголизованных реципиентов предполагает также непосредственное влияние введенных лимфоцитов на клетки ЦНС. Таким образом, модулированные *in vitro meta*-хлорбензгидрилмочевинной иммунокомпетентные клетки посредством относительно независимых механизмов оказывают позитивное психонейромодулирующее влияние при хронической интоксикации этанолом, что позволяет рассматривать адоптивную иммунотерапию в качестве возможного перспективного метода в лечении алкоголизма.

Ключевые слова: алкоголизм, *meta*-хлорбензгидрилмочевина, лимфоциты, головной мозг, поведение, цитокины, нейротрофический фактор мозга

DOI: 10.31857/S1027813323030123, EDN: YVAMDK

ВВЕДЕНИЕ

Представления о патогенезе алкоголизма претерпели определенную эволюцию в связи с достижениями в области наркологии, биохимии, нейробиологии и молекулярной биологии; к настоящему времени сформирована концепция о прин-

ципальном единстве стержневых механизмов формирования зависимости от психоактивных веществ [1]. По современным представлениям существенным звеном в патогенезе алкоголизма является нарушение обеспечивающих поддержание динамического гомеостаза нейроиммунных интегративных связей, характеризующееся дисбалансом нейромедиаторов и нейромодуляторов в ЦНС, усиленной продукцией аутоантител к нейромедиаторам, нарушением центральной и периферической

* Адресат для корреспонденции: 630099 Россия, Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14, e-mail: evgeniya_markova@mail.ru.

продукции цитокинов, эффекты которых опосредуются клеточными элементами нервной и иммунной систем [2–7].

Хроническая интоксикация этанолом вызывает развитие толерантности и зависимости, посредством взаимодействия этанола с ГАМКА/бензодиазепиновым рецепторным комплексом (ГАМКА/БДР) в различных структурах головного мозга. ГАМКА-рецепторы (ГАМКА-Р), представляют основную ингибиторную нейротрансмиттерную систему в ЦНС и играют центральную роль в опосредовании эффектов этанола [2, 7–9]. Описано также наличие функциональных ГАМКА-Р на поверхности иммунокомпетентных клеток, в частности, Т-лимфоцитов. Изменение активности ГАМКА-Р, аналогично эффектам на нейрональных клетках, вызывает модуляцию функциональной активности клеток иммунной системы дозозависимым образом [10, 11]. Хроническая интоксикация этанолом приводит к изменению функционального фенотипа периферических иммунокомпетентных клеток, снижает эффективность клеточного и гуморального иммунного ответа на инфекцию и вакцинацию, что может быть связано, в частности, с конверсией фенотипа наивных Т-лимфоцитов, с сокращением числа CD4 и CD8 субпопуляций лимфоцитов и модуляцией их функциональной активности. [12–14]. Показано также увеличение митоген-индуцированной продукции иммунокомпетентными клетками провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-12, ФНО- α [3, 5, 7, 14–16]; переход к провоспалительному ответу происходит посредством повышения фосфорилирования р65 субъединицы NF κ B, стимуляции транслокации NF κ B в ядро и большей продукции провоспалительных цитокинов [2, 19]. Механизмы воздействия этанола на иммунную систему также могут быть реализованы через изменение активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, которая, в свою очередь, находится под регулирующим влиянием цитокинов как периферического, так и центрального происхождения [8, 9, 17]. Обращает на себя внимание установленный факт того, что при хронической интоксикации этанолом, лимфоциты приобретают способность поддерживать/усиливать алкогольную мотивацию [18].

Мишенями действия этанола являются также бензодиазепиновые рецепторы (БДР). Бензодиазепины, связываясь со специфическими местами на ГАМКА-Р комплексе – бензодиазепиновыми рецепторами, изменяют его конформацию и аффинитет, аллостерически модулируя его функцию, потенцируя процессы торможения в структурах мозга, влияющих на активность разных нейромедиаторных систем. Хроническое употребление алкоголя вызывает нейроадаптивные изменения БДР, модулирующих ГАМКА-Р, что поддерживает алкогольную аддикцию [19]. В этой связи, приме-

нение искусственных лигандов БДР, оказывающих модулирующее действие на ГАМКА/БДР, стимулирующих ГАМК-медиацию, проявляющих иммуномодулирующие свойства, может обеспечить новый патогенетический подход к терапии алкоголизма. Оригинальный антиконвульсант, соединение *meta*-хлорбензгидрилмочевина, как установлено, повышает нейромедиацию ГАМК в мозге, обладая модулирующим действием на нейрональные рецепторы, в частности ГАМКА/БД-рецепторную систему [19, 20]. Наличие функциональных ГАМКА-Р на поверхности клеток иммунной системы, в частности, лимфоцитов обуславливает также выявленные нами ранее иммуномодулирующие свойства *meta*-хлорбензгидрилмочевины, определяемые состоянием организма; в частности, при хронической интоксикации этанолом указанное соединение условиях *in vitro* ГАМКА-Р-опосредованным образом снижает повышенную пролиферативную активность лимфоцитов и повышает их сниженную чувствительность к Т-клеточному митогену практически до уровня, характерного для лимфоцитов интактных животных [21, 21], что обуславливает позитивный психонейроиммуномодулирующий эффект соединения при хронической интоксикации этанолом при внутрижелудочном введении [23, 24]. Однонаправленное влияние большинства психоактивных препаратов на ЦНС и иммунную систему позволяет рассматривать иммунокомпетентные клетки в качестве модельных объектов для воздействия на межсистемную функциональную взаимосвязь и позволяет считать перспективным исследование возможности применения метода адоптивной иммунотерапии для ослабления характерной для хронического алкоголизма симптоматики. Весомым аргументом в пользу этого служат результаты экспериментальных иммунонейробиологических исследований, продемонстрировавших торможение усиленного потребления этанола алкоголизированными мышами после адоптивного переноса им спленоцитов, инкубированных *in vitro* с антителами к серотонину [18]. В лаборатории нейроиммунологии НИИФКИ также ранее было показано позитивное психонейроиммуномодулирующее влияние адоптивного переноса иммунокомпетентных клеток при поведенческих расстройствах, в том числе и индуцированных хронической интоксикацией психоактивным веществом [25–28]. Способность лимфоцитов после адоптивного переноса модулировать поведение и когнитивные функции, в том числе и путем непосредственного контакта с клетками ЦНС, в последние годы показана также и другими исследователями [29–32]. Принимая во внимание тот факт, что одним из патогенетических механизмов хронической алкогольной интоксикации является изменение функциональной активности иммунных клеток и приобретение лимфоцитами способности переносить алкогольную

мотивацию [18], подтвержденной и в собственных исследованиях (данные не приводятся), методом выбора в лечении алкоголизма, может стать иммунотерапия аутологичными лимфоцитами с экстракорпорально модулированной лигандом ГАМКА-Р функциональной активностью.

В связи с вышеизложенным, целью настоящего исследования было оценить центральные эффекты периферически введенных лимфоцитов с модулированной *in vitro* функциональной активностью синтетическим лигандом ГАМКА-Р метаклорбензгидрилмочевинной у длительно алкоголизованных животных.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные и модель хронической алкогольной интоксикации. Исследование выполнено на мышах-самцах (СВА × С57BL/6)F1 9.5–10-месячного возраста, полученных в возрасте 3-х месяцев из питомника НИЛЭМ (г. Томск). Животных содержали в условиях лабораторного вивария в клетках по 5–10 особей в каждой, на стандартной диете, при естественном световом режиме. Исследования с животными проводились в соответствии с законодательством Российской Федерации, положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, требованиях и рекомендациями Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных и были одобрены на заседании локально-этического комитета НИИФКИ (протокол заседания № 139 от 30.05.2022 г.).

Учитывая наличие в популяции самцов (СВА × С57BL/6)F1 особей с активным и пассивным типами поведения, различающимися по уровню потребления этанола [23, 24], с целью формирования однородных групп экспериментальных животных все мыши были предварительно протестированы в “открытом поле”, и в исследование были включены только особи со средним уровнем ориентировочно-исследовательского поведения (ОИП). Для моделирования хронической алкогольной интоксикации использовали метод принудительного спаивания, при котором мыши были вынуждены употреблять 10% раствор этанола в качестве единственного источника жидкости на протяжении 6 месяцев. Формирование зависимости от этанола оценивалось путем однократной инъекции налоксона (3 мг/кг, подкожно) с последующей визуальной регистрацией признаков “синдрома отмены” (корчи, судороги, скрежет зубами, отряхивания “мокрой собаки”, птоз, диарея).

Вещество. В качестве модулятора функциональной активности лимфоцитов длительно алкоголизованных мышей *in vitro* использовалось оригинальное соединение, метаклорбензгидрил-

мочевина, являющееся синтетическим лигандом ГАМКА-Р, нециклическим аналогом фенобарбитуратов с выявленными противосудорожными и иммуномодулирующими свойствами [19–24]. Соединение синтезировано в проблемной научно-исследовательской лаборатории синтеза лекарственных средств Национального исследовательского Томского политехнического университета в процессе поиска высокоэффективных антиконвульсантов.

Подготовка и трансплантация лимфоцитов. В качестве доноров и реципиентов иммунокомпетентных клеток использовались длительно алкоголизованные мыши-самцы (СВА × С57BL/6)F1. Животных-доноров забивали путем цервикальной дислокации; в стерильных условиях вскрывали брюшную полость, извлекали селезенку, очищали от соединительной ткани и помещали во флаконы с охлажденной до 40°C средой RPMI-1640 (5 мл на селезенку). Выделение селезеночных лимфоцитов производили путем перфузии селезенки с последующим удалением эритроцитов методом гемолитического шока и макрофагальной фракции спленоцитов адгезией на пластике в течение двух часов при температуре 37°C. Полученная суспензия на 88–93% состояла из лимфоидных клеток. Жизнеспособность клеток оценивалась по включению трипанового синего и составляла 93–95%. Далее селезеночные лимфоциты ресуспензировали в неполной среде RPMI-1640 (Sigma) и подвергали *in vitro* инкубации с метаклорбензгидрилмочевинной в концентрации 10 мкг/мл течение 30 мин. Затем производили трехкратную отмывку лимфоцитов от соединения в физиологическом растворе и ресуспензировали клетки в среде RPMI-1640. Прекультивированные с метаклорбензгидрилмочевинной лимфоциты вводили внутривенно сингенным длительно алкоголизованным реципиентам (15×10^6 клеток на одно животное). В качестве отрицательного контроля использовали длительно алкоголизованных мышей и сингенных реципиентов, которым были введены лимфоциты, прекультивированные в аналогичных условиях эксперимента, но в отсутствии метаклорбензгидрилмочевинной. В качестве положительного контроля использовали интактных животных соответствующего возраста.

Поведенческое тестирование. Алкогольную мотивацию оценивали по потреблению 10% раствора этанола в условиях свободного выбора с водой (двух-бутылочный оральный тест). Потребление 10% раствора этанола и воды длительно алкоголизованными мышами-реципиентами регистрировалось ежедневно в 10 ч утра в течение 7 дней, начиная с первого дня после клеточной трансплантации. Для этого в каждой клетке находились две поилки (с водой и 10% раствором этанола) для того, чтобы мыши могли потреблять жидкости в зависимости от индивидуальной потребности. Контрольные животные (длительно алкоголизованные и

интактные) находились в аналогичных условиях эксперимента.

ОИП животных оценивали в тесте “Открытое поле” [33], для этого использовалась стандартная установка, которая представляет собой камеру размером 100 × 100 см, с высокими бортами (40 см). Пол установки расчерчен на равные сектора (10 × 10 см), предназначенные для визуальной регистрации двигательной активности экспериментальных животных. Освещение осуществлялось с помощью бестеневой лампы мощностью 100 Вт, которая расположена над центром поля на высоте 100 см. Животное помещалось в угол камеры, и регистрировалась его моторная и исследовательская активность в течение 5 мин с интервалом в 1 мин. Для оценки исследовательской активности подсчитывалось количество вертикальных стоек (свободных и пристеночных – с опорой на борт камеры); для оценки моторной активности – количество пересеченных центральных и периферических квадратов поля. Эмоциональная реактивность определялась по количеству фекальных болюсов. Все эксперименты проводились в период с 10 до 14 ч.

Определение уровня цитокинов в головном мозге. Количественное содержание цитокинов определяли в лизатах патогенетически значимых структур головного мозга сингенных длительно алкоголизованных реципиентов иммунокомпетентных клеток (гиппокамп, гипоталамус, стриатум, фронтальная кора). Лизаты указанных структур головного мозга получали путем гомогенизирования тканей в среде RPMI-1640 с добавлением 0.1% Triton X-100 (GERBU Biotechnik GmbH), с последующим центрифугированием в течение 3 мин при 10000 об./мин. Надосадочную жидкость использовали для исследования. Содержание цитокинов в исследуемых образцах оценивали методом ИФА (ELISA) с использованием специфических тест-систем “eBioscience” (BenderMed Systems, Austria) для определения ИФН- γ , ИЛ-6 и “R&D Systems Inc.” (USA) для определения ИЛ-1 β , ИЛ-10, ФНО- α в соответствии с инструкцией фирм-производителей. Оптическую плотность исследуемых образцов измеряли при помощи спектрофотометра с вертикальным прохождением света Anthos 2020 (“AnthosLabtec”, Austria) при длине волны 450 нм. Результаты представлены в виде массовой концентрации (пг) на мг ткани.

Определение количественного содержания нейротрофического фактора в головном мозге. Количественное содержание нейротрофического фактора BDNF в головном мозге сингенных длительно алкоголизованных реципиентов определяли в супернатантах лизатов отдельных структур мозга, для которых показана наиболее выраженная экспрессия фактора (гиппокамп, фронтальная кора) методом ИФА (ELISA) с использованием специ-

фической тест-системы “R&D Systems Inc.” (USA) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Выделение и проточная цитофлуориметрия лимфоцитов головного мозга. Для выявления введенных внутривенно лимфоцитов в ткани головного мозга сингенных длительно алкоголизованных реципиентов была проведена прижизненная окраска прекультивированных с *мета*-хлорбензгидрилмочевинной лимфоцитов витальным красителем CFSE (Invitrogen, USA) по методике фирмы-производителя. Длительно алкоголизованных реципиентов забивали путем цервикальной дислокации на 3 сутки после трансплантации лимфоцитов с последующим выделением головного мозга. Клеточную суспензию ткани головного мозга перед проведением цитометрического исследования разделяли на трехступенчатом градиенте перколла (Sigma) по описанной методике для обогащения образцов лимфоцитарной фракцией [34]. Цитометрический анализ проводили с помощью проточного цитофлуориметра “BD FACSVerser” и программного обеспечения “BD FACSuite”.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ SPSS 11.0. При анализе количественных данных проверку на нормальность распределения фактических данных проводили с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для каждой из непрерывных величин определяли среднее (M) и стандартное отклонение (SD). При проведении сравнений независимых выборок, при числе групп = 2 в случае нормального распределения и равных дисперсий в группах применяли t -критерий Стьюдента для независимых наблюдений; при отклонении распределения от нормального применяли критерий Манна–Уитни. Для множественного сравнения показателей использовали критерий Крускала–Уоллиса. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в исследовании принимался $p \leq 0.05$. Объем выполненных исследований позволял оценить результаты с достоверностью 95–99% при использовании соответствующих статистических методов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе проведенного исследования установлено, что внутривенное введение сингенных лимфоцитов, прекультивированных с *мета*-хлорбензгидрилмочевинной, снижает алкогольную мотивацию у длительно алкоголизованных сингенных реципиентов, на что указывает снижение потребления указанными животными 10% раствора этанола в условиях свободного выбора с водой (рис. 1). В течение 7 дней тестирования среднесуточное потребление раствора этанола в группе контрольных интактных животных аналогичного возраста составило 0.6 ± 0.6 мл/день/мышь; в группе

контрольных длительно алкоголизованных животных — 6.9 ± 1.1 мл/день/мышь ($p < 0.01$); в группах длительно алкоголизованных реципиентов среднесуточное потребление этанола составило: после внутривенного введения сингенных лимфоцитов, прекультивированных без *мета*-хлорбензгидрилмочевины (Реципиенты 1) — 6.7 ± 2.7 мл/день/мышь ($p > 0.05$ по сравнению с контрольными длительно алкоголизованными мышами; $p < 0.01$ по сравнению с контрольными интактными мышами); после внутривенного введения сингенных лимфоцитов, прекультивированных с *мета*-хлорбензгидрилмочевинной (Реципиенты 2) — 2.4 ± 1.5 мл/день/мышь ($p < 0.05$ по сравнению с контрольными группами длительно алкоголизованных мышей, интактных мышей и группы “Реципиенты 1”).

Анализ поведения в “открытом поле” длительно алкоголизованных реципиентов сингенных лимфоцитов, прекультивированных с *мета*-хлорбензгидрилмочевинной, выявил повышение двигательной активности как в периферических, так и в центральных квадратах поля, а также манежного бега (повышение количества стоек с опорой на стенку поля), что свидетельствует о стимуляции ОИП (табл. 1). Обращает на себя внимание тот факт, что после трансплантации прекультивированных с *мета*-хлорбензгидрилмочевинной лимфоцитов у сингенных длительно алкоголизованных реципиентов наиболее выраженный эффект наблюдался в отношении стимуляции моторного компонента поведения, при этом не было выявлено существенного изменения эмоциональной реактивности реципиентов, оцененной по числу фекальных болюсов (данные не приводятся). Достоверных различий как в количестве потребляемого раствора этанола, так и в параметрах ОИП у реципиентов после трансплантации прекультивированных в отсутствие *мета*-хлорбензгидрилмочевинной иммунокомпетентных клеток по сравнению с контрольной группой длительно алкоголизованных мышей не выявлено, что свидетельствует в пользу того, что именно рецептор-опосредованное взаимодействие *мета*-хлорбензгидрилмочевинной с ГАМКА-рецепторным комплексом лимфоцитов длительно алкоголизованных мышей, путем выявленной нами ранее модуляции функциональной активности клеток [21], обуславливает продемонстрированный эффект редактирования периферически введенными иммунокомпетентными клетками характерных для хронической интоксикации этанолом поведенческих паттернов.

Хроническая интоксикация этанолом, как известно, приводит к нейровоспалению и нейродегенерации [2, 3, 4, 7, 35–37]. Нейровоспаление, характерное для хронического алкоголизма, обусловлено как прямым взаимодействием этанола с нейрональными и иммунными клетками мозга, так и с индукцией воспаления на периферии. Так,

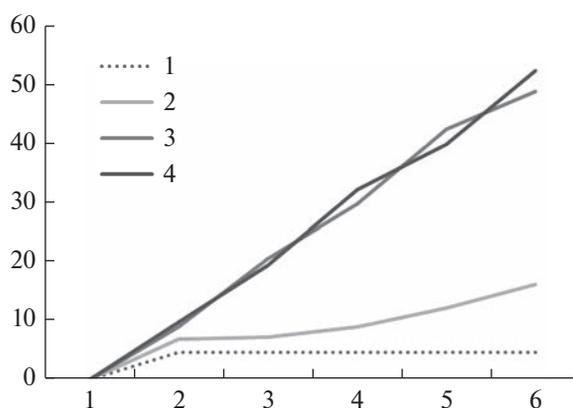


Рис. 1. Накопительное потребление 10% раствора этанола длительно алкоголизованными самцами (СВА × С57BL/6)F1 после внутривенного введения сингенных лимфоцитов, модулированных *in vitro* *мета*-хлорбензгидрилмочевинной. Примечания: Представлено среднесуточное потребление этанола (мл/мышь), начиная с 1-го дня после внутривенного введения лимфоцитов в условиях свободного выбора с водой. 1 — интактные животные. 2 — длительно алкоголизованные реципиенты после введения сингенных лимфоцитов, прекультивированных с *мета*-хлорбензгидрилмочевинной (Реципиенты 2). 3 — длительно алкоголизованные реципиенты после введения сингенных лимфоцитов, прекультивированных без *мета*-хлорбензгидрилмочевинной (Реципиенты 1). 4 — длительно алкоголизованные животные.

потребление этанола вызывает продолжительную активацию микроглии преимущественно в гиппокампе, опосредованную Toll-like рецепторами (TLRs) [3, 5, 7, 38, 39]. Выявлен также альтернативный путь активации TLR-4, опосредованный ГАМКА-рецепторами, являющимися основной мишенью действия этанола [40]. Хроническое воздействие этанола приводит к усиленной продукции провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-12, ФНО- α , ИФН- γ и повышению проницаемости гематоэнцефалического барьера [4, 5, 7, 15, 16, 37, 38]. Периферические цитокины, продуцируемые иммунокомпетентными клетками, проникая через гематоэнцефалический барьер, также оказывают модулирующее влияние на цитокиновую сеть мозга, а затем, посредством влияния на нейроэндокринные функции, нейротрансмиттерные системы и нейрональную активность вовлекаются в патофизиологические механизмы алкоголизма.

При исследовании количественного содержания патогенетически значимых цитокинов в отдельных структурах головного мозга длительно алкоголизованных реципиентов после трансплантации сингенных лимфоцитов, прекультивированных с *мета*-хлорбензгидрилмочевинной, было зарегистрировано снижение провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α в гипоталамусе, стриатуме и фронтальной коре, а также ИФН- γ в

Таблица 1. Показатели поведения в тесте “открытое поле” длительно алкоголизованных самцов (СВА × С57BL/6)F1 после внутривенного введения сингенных лимфоцитов, модулированных *in vitro* *meta*-хлорбензгидрилмочевинной

Группа	Горизонтальная двигательная активность			Вертикальная двигательная активность		
	периферическая	центральная	суммарная	свободная	с опорой на стенку	суммарная
Интактные животные	45.2 ± 4.5	7.0 ± 0.4	52,2 ± 4.9	1.3 ± 0.2	3.8 ± 0.3	5.1 ± 0.5
Длительно алкоголизованные животные	11.3 ± 1.5**	0**	11.3 ± 1.5**	0**	0**	0**
Реципиенты 1	15.9 ± 3.7**	0**	15.9 ± 3.7**	0**	0**	0**
Реципиенты 2	42.8 ± 3.7#	5.3 ± 0.7#*	48.1 ± 4.4#*	0**	2.6 ± 0.4*#	2.6 ± 0.4#*

Примечания: Реципиенты 1 – длительно алкоголизованные реципиенты после трансплантации сингенных спленоцитов, прекультивированных без *meta*-хлорбензгидрилмочевины. Реципиенты 2 – длительно алкоголизованные реципиенты после трансплантации сингенных спленоцитов, прекультивированных с *meta*-хлорбензгидрилмочевинной. Тестирование производилось на 3 сутки после трансплантации клеток. Результаты представлены в виде M ± SD; n = 22–25 в каждой группе; * p < 0.05, ** p < 0.01 по сравнению с интактными животными; # p < 0.01 по сравнению с длительно алкоголизованными животными.

гипоталамусе, стриатуме и гиппокампе; при этом выявлено повышение противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в гипоталамусе и гиппокампе (рис. 2), что указывает на снижение нейровоспаления. Исследования с использованием животных моделей показали, что нейровоспаление способствует поддержанию алкогольной зависимости [3, 7, 41]. Провоспалительные цитокины, являются также триггерами депрессивно-подобного поведения при алкоголизме, в том числе и путем модуляции активности ГАМКА-R в нейронах коры, гиппокампа и стриатума. В силу чего, установленная в настоящем исследовании модуляция цитокинового фона в этих структурах головного мозга может являться одним из механизмов продемонстрированной выше стимуляции двигательной активности длительно алкоголизованных реципиентов модулированных оригинальным антиконульсантом иммунокомпетентных клеток.

Существует мнение о том, что при хроническом алкоголизме нейровоспаление ассоциировано со снижением уровня мозгового нейротрофического фактора BDNF, вызывающего не только нарушения нейропластичности, но и являющегося причиной перехода от случайного употребления алкоголя к компульсивному [7, 41–43]. BDNF, белок из класса цитокинов, семейства факторов роста и подсемейства нейротрофинов; выявляющийся в глиальных и преимущественно в нейрональных клетках, является одним из факторов, поддерживающих дифференциацию, созревание

и выживаемость нейронов в нервной системе, угнетающих клеточный апоптоз и проявляющих нейропротекторный эффект в неблагоприятных условиях; при хронической интоксикации этанолом наблюдается неадаптивная пластичность, обусловленная снижением уровня BDNF [44, 45]. Вышеизложенное послужило основанием для исследования содержания BDNF в патогенетически значимых структурах головного мозга у длительно алкоголизованных реципиентов после трансплантации сингенных лимфоцитов с модулированной *meta*-хлорбензгидрилмочевинной функциональной активностью. Наиболее выраженная экспрессия BDNF показана в гиппокампе и фронтальной коре [45], где и было определено его количественное содержание.

В результате проведенных исследований установлено, что хроническая интоксикация этанолом привела, как и ожидалось, к снижению уровня BDNF в обеих исследованных структурах головного мозга; при этом наиболее выраженное снижение нейротрофического фактора регистрировалось в гиппокампе. После трансплантации модулированных *in vitro* оригинальным антиконульсантом лимфоцитов у сингенных длительно алкоголизованных реципиентов регистрировалось повышение количественного содержания BDNF в гиппокампе (табл. 2), свидетельствующее о стимуляции процессов нейропластичности. Принимая во внимание тот факт, что BDNF может выступать в качестве эндогенного отрицательного ре-

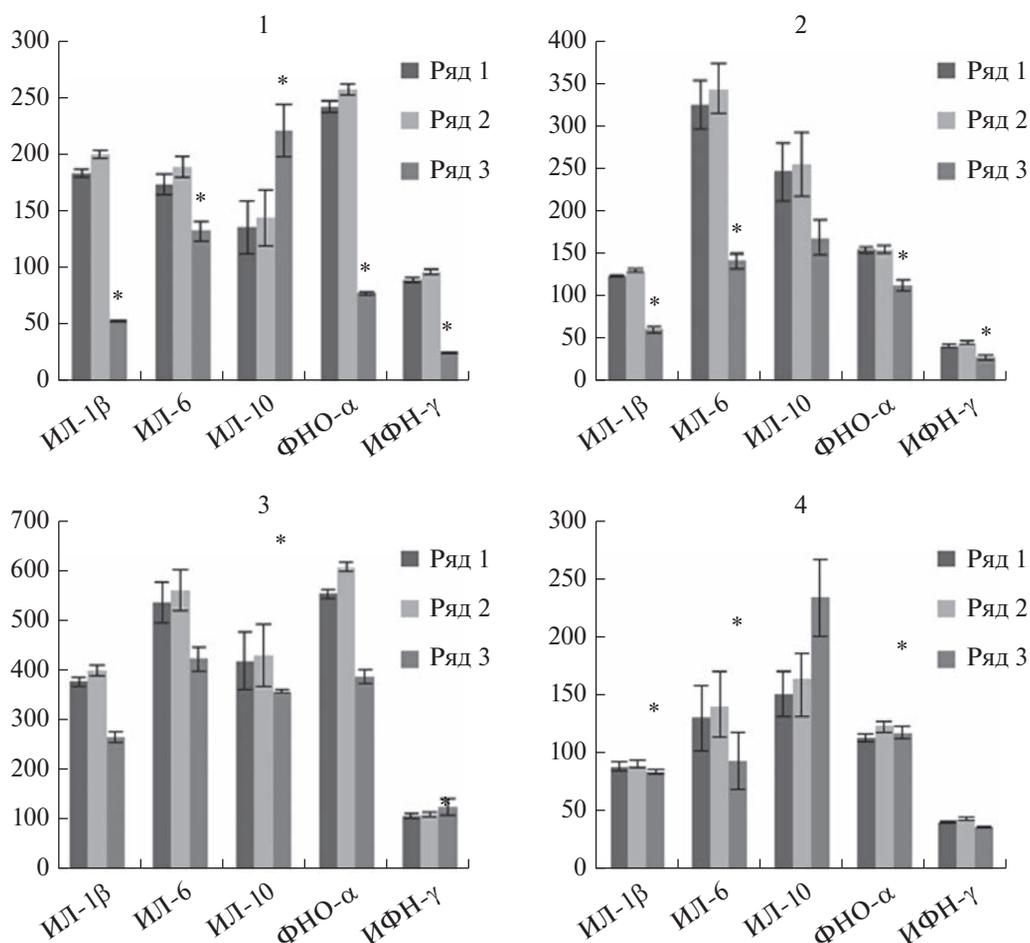


Рис. 2. Содержание цитокинов (пг/мл) в структурах головного мозга длительно алкоголизованных реципиентов (СВА × С57BL/6)F1 после внутривенного введения сингенных лимфоцитов, модулированных *in vitro* *meta*-хлорбензгидрилмочевинной. Примечания: 1 – гипоталамус; 2 – стриатум; 3 – гиппокамп; 4 – фронтальная кора. Ряд 1 – образцы супернатантов лизатов соответствующей структуры головного мозга длительно алкоголизованных животных. Ряд 2 – образцы супернатантов лизатов соответствующей структуры головного мозга длительно алкоголизованных реципиентов после введения сингенных лимфоцитов, прекультивированных без *meta*-хлорбензгидрилмочевинной (Реципиенты 1). Ряд 3 – образцы супернатантов лизатов соответствующей структуры головного мозга длительно алкоголизованных реципиентов после введения сингенных лимфоцитов, прекультивированных с *meta*-хлорбензгидрилмочевинной (Реципиенты 2). Результаты представлены в виде $M \pm SD$; $n = 10$ в каждой группе; * $p < 0.05$ между соответствующими показателями в группах реципиентов клеток.

гулятора потребления этанола и рассматривается как потенциальный фактор устойчивости к немотивированному употреблению алкоголя [44], логично предположить, что повышение уровня $BDNF$ и нейропластичности в гиппокампе является одним из механизмов продемонстрированного эффекта лимфоцитов, модулированных *meta*-хлорбензгидрилмочевинной, направленного на снижение алкогольной мотивации у длительно алкоголизованных реципиентов иммунокомпетентных клеток.

Имеются также данные о том, что не только цитокины, но и иммунокомпетентные клетки могут проникать в головной мозг и изменять функциональное состояние ЦНС, включая редактирование поведения, путем непосредственного контакта

с клетками головного мозга [34–37]. Обусловленная нейровоспалением повышенная проницаемость гематоэнцефалического барьера при хронической алкогольной интоксикации предполагает и этот механизм реализации выявленных центральных эффектов трансплантированных лимфоцитов. Подтверждением чему служит визуализация функционально активных лимфоцитов, прекультивированных с *meta*-хлорбензгидрилмочевинной в паренхиме головного мозга длительно алкоголизованных реципиентов (рис. 3). Доля меченных лимфоцитов, зафиксированная в мозге реципиентов, составляет примерно 0.5% от общего числа лимфоцитов головного мозга, причем на момент тестирования (3 сутки после системного введения клеток) регистрируются, как минимум,

Таблица 2. Содержание BDNF (пг/мл) в структурах головного мозга длительно алкоголизованных самцов (CBA × C57BL/6)F1 после трансплантации сингенных лимфоцитов, модулированных *in vitro* *мета*-хлорбензгидрилмочевинной

Структура мозга	Интактные животные	Длительно алкоголизованные животные	Реципиенты 1	Реципиенты 2
Фронтальная кора	112.1 ± 11.3	93.9 ± 5.4*	91.7 ± 6.9*	90.7 ± 7.8*
Гиппокамп	115.9 ± 9.1	83.9 ± 7.2*	86.4 ± 9.3*	113.4 ± 6.2 [≠]

Примечания: Реципиенты 1 – длительно алкоголизованные реципиенты после трансплантации сингенных спленоцитов, прекультивированных без *мета*-хлорбензгидрилмочевины. Реципиенты 2 – длительно алкоголизованные реципиенты после трансплантации сингенных спленоцитов, прекультивированных с *мета*-хлорбензгидрилмочевинной. Результаты представлены в виде M ± SD. n = 6 в каждой группе; * p < 0.05 по сравнению с интактными животными; [≠] p < 0.05 по сравнению с длительно алкоголизованными животными и группой “Реципиенты 1”.

две четко выраженных генерации лимфоцитов (рис. 3, цитограмма б), свидетельствующие об их выраженной пролиферативной активности, что убедительно свидетельствует о том, что введенные иммунокомпетентные клетки в мозге функционально активны и показанные выше центральные эффекты могут быть, в том числе, и результатом непосредственного влияния модулированных *мета*-хлорбензгидрилмочевинной лимфоцитов на ЦНС.

Следовательно, анализ данных литературы в совокупности с результатами собственных исследований, позволяет рассматривать существование комплекса относительно независимых механизмов реализации выявленных в исследовании центральных эффектов системно введенных иммунокомпетентных клеток с измененной *ex vivo* оригинальным

антиконвульсантом функциональной активностью у сингенных длительно алкоголизованных реципиентов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, модулированные *in vitro* оригинальным антиконвульсантом *мета*-хлорбензгидрилмочевинной иммунокомпетентные клетки после внутривенного введения длительно алкоголизованным сингенным реципиентам оказывают позитивный психонейромодулирующий эффект, проявляющийся в редактировании характерных для хронической интоксикации этанолом паттернов поведения на фоне снижения нейровоспаления и стимуляции нейропластичности, что служит экс-

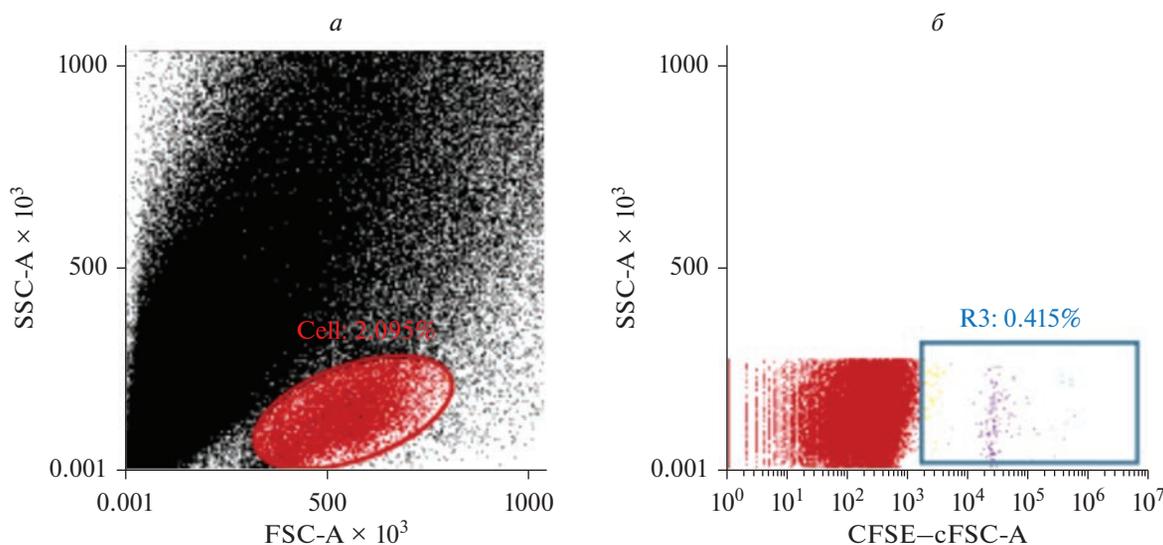


Рис. 3. Цитограмма лимфоцитарной фракции клеток головного мозга длительно алкоголизованных реципиентов (CBA × C57BL/6)F1 после внутривенного введения меченных CFSE сингенных лимфоцитов, модулированных *in vitro* *мета*-хлорбензгидрилмочевинной. Примечания: а – диаграмма фронтального-бокового рассеяния, [cell] – область иммуноцитарного облака. б – диаграмма бокового рассеяния против CFSE, гейтирована по области [cell] цитограммы а, предназначена для выявления относительного содержания меченных CFSE лимфоцитов от общего числа лимфоцитов.

периментальным обоснованием разработки новых подходов к терапии алкоголизма с использованием клеточных технологий.

БЛАГОДАРНОСТИ

Коллектив авторов выражает благодарность старшему научному сотруднику Томского национального исследовательского медицинского центра РАН к.м.н., Шушпановой Т.В. за предоставление соединения мета-хлорбензгидрилмочевина для исследования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств федерального бюджета на проведение фундаментальных научных исследований по теме № 122011800324-4 (2021-2023) “Обоснование и разработка новых технологий иммуномодуляции, стимуляции репаративных процессов и коррекции поведенческих и аддиктивных расстройств на основе использования миелоидных, лимфоидных и стволовых клеток и/или продуктов их секрета”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Этическое одобрение. Исследования с животными проводились в соответствии с законодательством Российской Федерации, положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22.09. 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, требованиями и рекомендациями Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных и были одобрены на заседании локально-этического комитета НИИФКИ (протокол заседания № 139 от 30.05.2022 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анохина И.П. // Вопросы наркологии. 2018. № 2. С. 22–34.
2. Ward R.J., Lallemand F., De Witte P. // Alcohol & Alcoholism. 2009. V. 44 (2). P. 128–135.
3. Kelley K.W., Dantzer R. // Brain. Behav. Immun. 2011. V. 25 (S1). P. S13–S20.
4. Crews F.T., Lawrimore C.J., Walter T.J., Coleman L.G. // Neuropharmacol. 2017. V. 122. P. 56–73.
5. Meredith L.R., Burnette E.M., Grodin E.N., Irwin M.R., Ray L.A. // Brain. Behav. Immun. 2021. V. 97. P. 349–364.
6. Blaine S.K., Sinha R. // Neuropharmacol. 2017. V. 122. P. 136–147.
7. Pérez-Reytor D., Karahanian E. // The American Journal of Drug and Alcohol Abuse. 2022. <https://doi.org/10.1080/00952990.2022.2114005>
8. Follsea P., Floris G., Asuni G.P., Ibba A., Tocco M.G., Zicca L., Gorini G. // Front. in Cell. Neurosci. 2015. V. 9. P. 445.
9. Centanni S.W., Teppen T., Risher M., Fleming, R.L., Moss J.L., Acheson S.K. et al. // Alcohol. Clin. Exp. Res. 2014. V. 38. P. 2800–2808.
10. Alam S., Walding A // Mol. Immunol. 2006. V. 43. № 9. P. 1432–1442.
11. Mendu S.K., Akesson L., Jin Z., Edlund A., Cilio C., Lernmark A., Birnir B. // Mol. Immunol. 2011. V. 48. № 4. P. 399–407.
12. Zhang H., Meadows G.G. // J. Leukocyte Biol. 2005. V. 78. № 5. P. 1070–1080.
13. Zuluaga P., Sanvisens A., Caceres E.M., Muga R. // Drug and Alcohol Dependence. 2017. V. 180. P. 7–13.
14. Sureshchandra S., Raus A., Jankeel A., Ligh B.J.K., Walter N.A., Newman N., Messaoudi I. // Scientific Reports. 2019. V. 9. № 1. P. 1–13.
15. Pang M., Bala S., Kodys K., Catalano D., Szabo G. // BMC Immunology. 2011. V. 12. № 1. P. 1–11.
16. Crews F.T., Sarkar D.K., Qin L., Zou J., Boyadjieva N., Vetreno R.P. // Alcohol Res. 2015. V. 37. P. 331–351.
17. Boyd K.N., Kumar S., O’Buckley T.K. // J. Neurochem. 2010. V. 112. № 3. P. 784–796.
18. Evseev V.A., Davydova T.V., Mikovskaya O.I. // Bull. Exp. Biol. Med. 2001. V. 131. № 4. P. 364–368.
19. Shushpanova T.V., Solonsky A.V., Bokhan N.A., Novozheeva T.P., Udut V.V., Arbit G.A., Filimonov V.D. // J. Alcohol Drug Depend. 2016. V. 4. № 234. P. 2.
20. Novozheeva T., Markova E., Shushpanova O., Knyazeva E., Shushpanova T. // European Psychiatry. 2019. V. 56. P. S15.
21. Маркова Е.В., Савкин И.В., Шушпанова Т.В., Княжева М.А., Аникеева О.С. // Изобретения и полезные модели. Официальный бюллетень федеральной службы по интеллектуальной собственности. 2019. № 17. RU 2691143 C1.
22. Markova E., Savkin I., Anikeeva O., Shushpanova T. // European Psychiatry. 2019. V. 56(S). P. 662–663.
23. Markova E., Knyazheva M., Savkin I., Shushpanova T. // European Psychiatry. 2017. V. 41(S1). P. 742–743.
24. Markova E.V., Savkin I.V., Knyazheva M.A., Shushpanova T.V. // Siberian Herald of Psychiatry and Addiction Psychiatry. 2020. V. 1 (106). P. 14–22 (in Rus).
25. Markova E., Starostina M., Abramov V., Kozlov V. / Proceedings of the 2nd European Congress of Immunology. Free Papers. Editors Reinhold E. Schmidt. MEDIMOND S.r.l., Bolonga, Italy. 2009. P. 423–429.
26. Markova E.V., Knyazheva M.A. // Medical Immunology (Russia). 2021. V. 23 (4). P. 699–704.
27. Markova E.V., Knyazheva M.A., Tikhonova M.A., Amsitslavskaya T.G. // Neurosci. Lett. 2022. V. 786. P. 136790.
28. Markova E.V., Serenko E.V. // Siberian Herald of Psychiatry and Addiction Psychiatry. 2022. V. 3 (116). P. 5–13 (in Rus).
29. Rattazzi L., Piras G., Ono M., Deacon R., Pariante C.M., Acquisito F.D. // Transl. Psychiat. 2013. V. 3. P. 280.
30. Radjavi A., Smirnov I., Kipnis J. // Brain Behav. Immun. 2014. V. 35. P. 58–63.

31. Song C, Nicholson J.D., Clark S.M., Li X., Keegan A.D., Tonelli L.H. // *Brain Behav. Immun.* 2016. V. 57. P. 161–172.
32. Clark S.M., Vaughn C.N., Soroka J.A., Li Xi, Tonelli L.H. // *Eur. J. Neurosci.* 2018. V. 47. P. 968–978.
33. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д.П. / Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М., 1991. 399 с.
34. Prasad S., Hu S., Sheng W.S., Singh A., Lokensgard J.R. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 12. P. e0145457.
35. Crews, F.T., Collins M.A., Dlugos C., Littleton J., Wilkins L., Neafsey E.J., Noronha A. // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research.* 2004. V. 28. № 2. P. 350–364.
36. Topiwala, A., Allan, C.L., Valkanova, V., Zsoldos, E., Filippini, N., Sexton, C., Mahmood, A., Fooks, P., Singh-Manoux, A., Mackay, C.E., Kivimäki, M., Ebmeier, K.P. // *BMJ.* 2017. V. 357. P. j2353.
37. Lowe P.P., Morel C., Ambade A., Iracheta-Vellve A., Kwiatkowski E., Satishchandran A., Szabo G. // *J. Neuroinflammation.* 2020. V. 17. P. 1–18.
38. Flores-Bastías O., Karahanian E. // *Neuropharmacol.* 2018. V. 128. P. 401–407.
39. Airapetov M., Eresko S., Lebedev A., Bychkov E., Shabanov P. // *Biosci. Trends.* 2021. V. 15. № 2. P. 74–82.
40. Aurelian L., Balan I. // *Psychopharmacol.* 2019. V. 236. P. 3023–3043.
41. Logrip M.L., Barak S., Warnault V., Ron D. // *Brain Res.* 2015. V. 1628. P. 60–67.
42. Ceballos N., Sharma S. // *AIMS Neurosci.* 2016. V. 3. № 4. P. 398–432.
43. Peregud D.I., Panchenko L.F., Gulyaeva N.V. // *J. Addict. Problems.* 2016. № 9–10. P. 29–41 (in Rus).
44. Feltenstein M.W., See R.E. // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* 2013. V. 3. № 5. P. a011916.
45. Popova N.K., Ilchibaeva T.V., Antonov E.V., Pershina A.V., Bazovkina D.V., Naumenko V.S. // *Alcohol.* 2020. V. 87. P. 1–15.

Central Effects of Peripherally Introduced Immune Cells Modulated by an Original Anticonvulsant in Experimental Alcoholism

E. V. Markova^a, I. V. Savkin^a, E. V. Serenko^a, M. A. Knyazheva^a, and Yu. A. Shevchenko^a

^a Federal State Budgetary Scientific Institution “Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology”, Novosibirsk, Russia

Violation of neuroimmune regulatory interrelation, caused, in particular, by a change in the immune cell’s functional phenotype due to chronic ethanol intoxication, is an essential link in the pathogenesis of alcoholism. The unidirectional influence of most psychoactive drugs on the cells of the nervous and immune systems allows to consider immune cells as model objects for influencing intersystem functional interrelation. Based upon our own priority data on the presence of immunomodulatory properties in chronic alcohol intoxication at the original anticonvulsant acting on the molecular targets of ethanol influence in the central nervous system and the immune system, the aim of the present study was to evaluate the central effects of peripherally injected lymphocytes with *in vitro* modulated functional activity by a synthetic ligand of the GABAA-receptor complex *meta*-chlorobenzhydrylurea in long-term alcoholized animals. It was shown that transplantation of lymphocytes pre-cultivated with the anticonvulsant in syngeneic long-term alcoholic recipients achieves a decrease in alcohol motivation and stimulation of behavioral activity in the “open field” test. Editing of behavioral patterns characteristic for chronic alcohol intoxication was recorded against the background of a decrease in pathogenetically significant brain structures of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ and an increase in the anti-inflammatory cytokine IL-10, as well as an increase in the level of BDNF in the hippocampus, which allows us to consider a decrease in neuroinflammation and stimulation neuroplasticity as possible mechanisms for editing the behavior of recipients. Visualization of functionally active lymphocytes pre-cultured with *meta*-chlorobenzhydrylurea in the brain’s parenchyma of long-term alcoholized recipients also suggests a direct effect of injected lymphocytes on CNS cells. Thus, immune cells modulated *in vitro* with *meta*-chlorobenzhydrylurea by relatively independent mechanisms have positive psychoneuromodulating effects in chronic ethanol intoxication, which makes it possible to consider adoptive immunotherapy as a promising method in the treatment of alcoholism.

Keywords: alcoholism, *meta*-chlorobenzhydrylurea, lymphocytes, brain, behavior, cytokines, brain-derived neurotrophic factor

РОЛЬ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ РАЗВИТИИ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ ПОЛИНЕЙРОПАТИИ

© 2023 г. Л. А. Щепанкевич^{1, 2, 3, *}, М. А. Первунинская^{1, 2}

¹ФГБОУ ВО Новосибирский государственный медицинский университет МЗ РФ,
Новосибирск, Россия

²ФГБНУ “Федеральный исследовательский центр фундаментальной
и трансляционной медицины”, Новосибирск, Россия

³ГБУЗ Новосибирской области “Государственная Новосибирская областная клиническая больница”,
Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 05.02.2023 г.

После доработки 11.04.2023 г.

Принята к публикации 27.04.2023 г.

Диабетическая периферическая невропатия (ДПН) является наиболее частым осложнением диабета и связана со значительной заболеваемостью и смертностью. Патологические механизмы, приводящие к развитию ДПН, исследованы не в полной мере и до сих пор являются дискуссионными. В настоящее время обсуждаются иммуноопосредованные механизмы ее развития. Целью представленной работы явилось изучение содержания ФНО- α в сыворотке крови пациентов с СД2, осложненным ДПН и оценка значения данного фактора в развитии и прогрессировании ДПН. Проведено открытое сравнительное исследование с участием 83 больных СД2 разной продолжительности течения. У пациентов с клинической манифестацией ДПН и длительным течением СД2 (2 группа) уровень ФНО- α был значимо выше в сравнении с пациентами СД2 и длительностью ДПН менее 2 лет, также обе исследуемые группы пациентов с СД2 и ДПН отличались высоким уровнем ФНО- α в сравнении с группой контроля. Полученные результаты свидетельствуют о более агрессивном иммуноопосредованном процессе, развивающемся при более длительном течении СД2 и вносящему свой негативный вклад в функционирование периферического нервного волокна.

Ключевые слова: сахарный диабет 2 типа, диабетическая периферическая полинейропатия, фактор некроза опухоли- α , ФНО- α

DOI: 10.31857/S1027813323040210, EDN: ORYTBS

Осложнения сахарного диабета 2 типа (СД2) обуславливают рост заболеваемости, инвалидности и смертности и представляют угрозу для экономики всех стран [1].

Диабетическая периферическая невропатия (ДПН) является наиболее частым осложнением диабета и связана со значительной заболеваемостью и смертностью. ДПН характеризуется прогрессирующей дистально-проксимальной дегенерацией периферических нервов, что приводит к боли, слабости мышц и возможной потере чувствительности [2].

Диабетическая невропатия является широко распространенным осложнением СД2, поражающим более 50% людей с диабетом. Могут развиваться различные типы заболеваний периферических нервов, наиболее частым из которых является

дистальная симметричная полинейропатия, поражающая нервные волокна конечностей билатерально, симметрично и прогрессирующая в дистально-проксимальном направлении [3].

В целом патологический процесс при ДПН неспецифичен, а многочисленные исследования указывают на его полиэтиологическую природу: в основе развития диабетической невропатии и других осложнений СД, лежит комплекс метаболических, сосудистых и генетических факторов риска. В то же время патологические механизмы, приводящие к развитию диабетической полинейропатии, исследованы не в полной мере и до сих пор являются дискуссионными, включая и роль факторов неспецифического воспаления [4].

Основной этиологической причиной ДН на сегодняшний день считается гипергликемия (как хроническая, так и эпизодическая), запускающая каскад клеточных патологических процессов посредством активизации альтернативных путей

* Адресат для корреспонденции: 630091, Новосибирск, Красный проспект 52, e-mail: shepankevich@rambler.ru.

окисления глюкозы, формирования оксидативного и нитрозативного стресса, вовлечения ростовых и сосудистых факторов [5]. Ожирение, часто коморбидное СД2, входящее в понятие метаболического синдрома – второй наиболее важный метаболический фактор риска развития нейропатии [6], другие независимые факторы риска включают возраст, длительность нарушений углеводного обмена, курение, артериальную гипертензию, гипертриглицеридемию, потребление алкоголя, высокий рост [5–7].

Интенсивный контроль и коррекция уровня глюкозы в крови далеко не всегда позволяет добиться полного устранения метаболических и сосудистых нарушений, возникших вследствие СД2. Строгий контроль уровня глюкозы позволяет значительно снизить частоту возникновения ДНП при СД1, но практически не влияет на аналогичное состояние при СД2 (которым страдает около 90% больных), несмотря на более чем 10-летний контроль уровня глюкозы, что указывает на различные механизмы, лежащие в основе ДНП при каждом расстройстве. Также все чаще в качестве патогенного фактора, способствующего развитию нейропатии при СД2, наряду с гипергликемией, рассматривается дислипидемия. Микроангиопатия является фундаментальной патологией диабета, при которой развивается эндотелиальная дисфункция (в том числе и в *vasa neurogum*), приводящая к нарушению вазодилатации за счет многих факторов, что также играет роль в развитии ДНП.

Многочисленные исследования свидетельствуют, что повреждающее действие на нервное волокно оказывает не только факт хронической гипергликемии, дислипидемии и микроангиопатии, но и механизмы развития и поддержания неспецифического воспаления. В настоящее время обсуждаются иммуноопосредованные механизмы ее развития.

Повышение концентрации циркулирующих в крови маркеров воспаления у больных СД2 и длительным анамнезом ДПН подтверждает гипотезу возможного вклада в развитие нейропатии неспецифического воспаления. Имеющиеся в литературе немногочисленные данные, указывают на возможную роль некоторых цитокинов в патогенезе поражения периферических нервных волокон [6, 7]. Доклинические исследования показали, что жировая ткань продуцирует фактор, подавляющий действие инсулина – это фактор некроза опухоли-альфа (ФНО- α), путем ингибирования тирозинкиназного рецептора к инсулину и уменьшения экспрессии гена, ответственного за синтез транспортера глюкозы (ГЛЮТ-4).

Также ФНО- α играет роль в развитии неспецифического воспаления при ряде аутоиммунных и системных процессов, однако роль его в запуске, поддержании и прогрессировании повреждения нервного волокна при СД2 недостаточно ясна. ФНО- α относится к классу цитокинов – белков, которые вырабатываются различными клетками иммунной системы для регуляции комплекса межклеточных взаимодействий при иммунном ответе. ФНО- α – гликопротеин с молекулярной массой 17400 кДа. Он продуцируется макрофагами, эозинофилами и естественными киллерами (14% лимфоцитов). У здоровых людей сыворотке крови ФНО-альфа практически не определяется, у больных же СД2 типа содержание ФНО- α в сыворотке крови повышено [8, 9].

Установлено, что ФНО- α , участвующий во многих патологических процессах, приводящих к изменениям в сосудистой стенке, к дефициту секреции и действию инсулина, также приводит к нарушению функции периферических нервов (ремоделированию нервного волокна) посредством уменьшения экспрессии фактора роста нервов [10, 11].

Согласно современным данным, уже на этапе предиабетических нарушений углеводного обмена, имеет место повреждение нервного волокна, вероятно и разная длительность нарушенного углеводного обмена при СД2 также взаимосвязана с интенсивностью неспецифического воспаления, что может манифестировать разным уровнем сывороточного ФНО- α . Именно эта гипотеза легла в основу нашего исследования [12].

Цель исследования: изучить содержание ФНО- α в сыворотке крови пациентов с СД2, осложненным ДПН и оценить значение данного фактора в развитии и прогрессировании ДПН.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Проведено открытое сравнительное исследование с участием 83 больных СД2 (целевой уровень HbA1c <8%). Пациенты были разделены на две исследуемых группы в зависимости от длительности СД2, осложненного ДПН: **1 группу** составили 34 человека (мужчины – 13, женщины – 21), продолжительность основного заболевания (СД2) менее 2х лет (1.2 ± 0.6 лет), средний возраст пациентов этой группы составил 61 ± 1.2 лет,

2 группа состояла из 34 пациентов (15 мужчин и 19 женщин). Средний возраст обследуемых 2 группы составил 62.6 ± 0.7 лет, средняя длительность СД2 6.8 ± 0.5 года.

В исследовании применялись клинико-неврологические, лабораторные, нейрофизиологические и анамнестические методы исследования.

Таблица 1. Сравнительная характеристика исследуемых групп

Показатель	Ср. возраст, лет	Пол, м/ж	ИМТ, кг/м ²	Средняя длительность СД2, лет	ВАШ	NSS	NDS
Группа 1 (n = 34)	61 ± 1.2	13/21	34.3 ± 1.6	1.2 ± 0.6*	5.81 ± 0.4	7.34 ± 0.2	10.27 ± 0.5
Группа 2 (n = 34)	62.6 ± 0.7	15/19	33.7 ± 1.8	6.8 ± 0.5*	6.03 ± 0.5	6.78 ± 0.4	10.61 ± 0.3

Примечание. * $p < 0.05$ статистически значимые различия между 1 и 2 группами.

ДПН у исследуемой группы пациентов, подтверждалась традиционной оценкой неврологического статуса с использованием визуальной аналоговой шкалы (ВАШ) для диагностики боли и шкал NSS (Нейропатический Симптоматический Счет), NDS (Нейропатический Дисфункциональный Счет) для оценки выраженности неврологического дефицита.

Согласно клинической оценки по представленным шкалам, 1 и 2 группы достоверно не различались. Также группы были однородны и сопоставимы по проводимой терапии, в качестве сахароснижающей терапии пациенты обеих групп принимали метформин (средняя доза 973.7 ± 62.7 мг) и глибенкламид (средняя доза 6.5 ± 0.38 мг).

Таким образом, по клиническим характеристикам пациенты обеих исследуемых групп были сопоставимы, достоверно различаясь лишь по длительности основного заболевания (СД2) (см. табл. 1).

Проведению электронейромиографии (ЭНМГ) подвергались только пациенты с клинической манифестацией ДПН с целью подтверждения поражения нервного волокна. Количественную оценку скорости проведения электрического импульса проводили с целью анализа состояния периферических нервных волокон с использованием аппарата American Nicolet Viking IV (электронейромиограф) с количественной оценкой скорости проведения по периферическому нерву.

Группу контроля (**группа 3**) составили 15 человек с СД2, без признаков ДПН, сопоставимых по полу и возрасту, а также по клиническим характеристикам оцениваемых клинических параметров.

Методом иммуноферментного анализа больным всех оцениваемых групп (1, 2, 3) в сыворотке крови определяли уровень цитокина ФНО- α (тест-системы ЗАО “Вектор-Бест” г. Новосибирск).

Критериями включения в исследование явились пациенты обоего пола в возрасте старше 18 лет, страдающие СД2 с наличием признаков

ДПН и высоким уровнем ФНО- α , подписавшие информированное согласие. Критериями невключения служили полинейропатия недиабетического генеза; прием препаратов, оказывающих непосредственное влияние на иммунную систему.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием лицензионного пакета статистических программ SPSS version 11.5 for Windows. Проведен однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Данные представляли в виде среднего арифметического (M), ошибки среднего арифметического ($\pm m$). Статистически значимыми считались различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Клинические проявления ДПН у пациентов всех исследуемых групп (1 и 2) с СД2 проявлялась различными симптомами со стороны чувствительной и двигательной сфер. Ведущими жалобами пациентов обеих исследуемых групп были дискомфорт и/или боль в области стоп.

Характер сенсорных нарушений был представлен следующим образом – снижение болевой чувствительности определено у 68% (1 группа), 66% (2 группа) пациентов, температурной – 31.4/33.1% соответственно 1 и 2 группы, нарушение вибрационной чувствительности выявлялось у 41.2% (1 группа) и 42.1% (2 группа) больных с преобладанием гипестезии на 1-м пальце стопы в сравнении с лодыжкой (21.5/22.6% соответственно); снижение тактильной чувствительности определялось в 6.8/7.1% (1 и 2 группы) случаев. Оценка двигательной сферы характеризовалась снижением ахиллова рефлекса (72.5/77.1%), коленного рефлекса (39.9/39.1%) у пациентов 1 и 2 групп соответственно.

При проведении ЭНМГ у пациентов с манифестацией ДПН отмечалось снижение скорости проведения по моторным и сенсорным волокнам периферических нервов, однако состояние про-

Таблица 2. Уровень ФНО- α (пг/мл) в исследуемых группах

Показатель	ФНО- α
Группа 1	3.14 \pm 0.8 пг/мл*/**
Группа 2	4.68 \pm 1.3 пг/мл*/**
Группа 3	2.36 \pm 1.6 пг/мл

Примечание: * $p \leq 0.05$ статистически значимые различия между 1 и 2 группами. ** $p \leq 0.05$ статистически значимые различия 1 и 2 групп с группой контроля (3).

водимости было значимо ниже во 2 группе ($p < 0.05$), с более выраженными признаками поражения моторных волокон.

Отмечались различия между группами в уровне ФНО- α , который был повышен в 1.9 раза (1 группа) и 2.9 раза (2 группа) ($p < 0.05$). При проведении корреляционного анализа взаимосвязи уровня ФНО- α и степенью сенсо-моторной дисфункции по ЭНМГ, прямая зависимость отмечена между уровнем ФНО- α и скоростью проведения по нерву ($p < 0.05$) как в первой, так и во второй группе.

Подобные результаты в работах Kartika R.W. et al., Várkonyi T. et al., Thakur V. et al. представлены на животных моделях ДПН [6, 7, 13].

Последнее десятилетие широко дискутируют вопросы о разнообразии механизмов, запускающих развитие ДПН и способствующих ее прогрессированию, в том числе иммуноопосредованные механизмы [14].

В результате проведенной работы, нами установлено, что у пациентов с клинической манифестацией ДПН и длительным течением СД2 (2 группа) уровень ФНО- α определяется в пределах 4.68 \pm 1.3 пг/мл, что было значимо выше в сравнении с пациентами СД2 и длительностью ДПН менее 2 лет (3.14 \pm 0.8 пг/мл), также обе исследуемые группы пациентов с СД2 и ДПН отличались высоким уровнем ФНО- α в сравнении с группой контроля (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о более агрессивном иммуноопосредованном процессе, развивающемся при более длительном течении СД2 и вносящему свой негативный вклад в функционирование периферического нервного волокна. Результат этого влияния зависит от длительности СД2, метаболических расстройств, но отрицать значимость неспецифического воспаления невозможно. Несомненно, нужны дополни-

тельные исследования с отражением роли иных молекулярных маркеров воспаления, проведение более масштабных по количеству пациентов работ, которые позволят удовлетворить не только исследовательский интерес, но и внесут свой вклад в практическую медицину. В клинической практике определение иммунологических показателей, в частности ФНО- α , может использоваться в качестве биомаркера для определения и подтверждения факта наличия диабетической периферической нейропатии, степени агрессивного влияния на периферические нервные структуры.

ВЫВОДЫ

Высокий уровень маркеров воспаления ФНО- α у больных СД2 и длительным анамнезом ДПН подтверждает гипотезу о роли неспецифического воспаления в развитии нейропатии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Maffi P., Secchi A. // Dev. Ophthalmol. 2017. V. 60. P. 1–5.
- Дедов И.И., Шестакова М.В., Вукулова О.К. // Сахарный диабет. 2015. Т. 18. № 3. С. 5–23
- Callaghan B.C., Cheng H.T., Stables C.L., Smith A.L., Feldman E.L. // Lancet Neurol. 2012. V. 11. № 6. P. 521–534.
- Zubair M., Ahmad J. // Rev. Endocr. Metab. Disord. 2019. V. 20. № 2. P. 207–217.
- Kartika R.W., Alwi I., Suyatna F.D., Yunir E., Waspadji S., Immanuel S., Silalahi T., Sungkar S., Rachmat J., Reksodiputro M.H., Bardosono S. // Heliyon. 2021. V. 7. № 9. P. e07934
- Várkonyi T., Körei A., Putz Z., Martos T., Keresztes K., Lengyel C., Nyiraty S., Stirban A., Jermendy G., Kempler P. // Minerva Med. 2017. V. 108. № 5. P. 419–437.
- Wang Y., Shao T., Wang J., Huang X., Deng X., Cao Y., Zhou M., Zhao C. // Biomed. Pharmacother. 2021. V. 133. P. 110991.

8. Cheng Y.C., Chiu Y.M., Dai Z.K., Wu B.N. // *Cells*. 2021. V. 10. № 10. P. 2688.
9. Ristikj-Stomnaroska D., Risteska-Nejashmikj V., Papazova M. // *Open Access Maced. J. Med. Sci.* 2019. V. 7. № 14. P. 2267–2270.
10. Mu Z.P., Wang Y.G., Li C.Q., Lv W.S., Wang B., Jing Z.H., Song X.J., Lun Y., Qiu M.Y., Ma X.L. // *Mol. Neurobiol.* 2017. V. 54. № 2. P. 983–996.
11. Diaz M.M., Caylor J., Strigo I., Lerman I., Henry B., Lopez E., Wallace M.S., Ellis R.J., Simmons A.N., Keltner J.R. // *Front. Pain Res (Lausanne)*. 2022. V. 3. P. 869215.
12. Thakur V., Sadanandan J., Chattopadhyay M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 3. P. 881.
13. Храмин В.Н., Демидова И.Ю. // *Эффективная фармакотерапия*. 2020. Т. 16. № 12. С. 42–54.
14. Attal N. // *Rev. Neurol. (Paris)*. 2019. V. 175. № 1–2. P. 46–50.

The Role of Nonspecific Inflammation in the Development of Diabetic Polyneuropathy

L. A. Shchepankevich^{a, b, c} and M. A. Pervuninskaya^{a, b}

^a*Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia*

^b*Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, Russia*

^c*State Novosibirsk Regional Clinical Hospital, Novosibirsk, Russia*

Diabetic peripheral neuropathy (DPN) is the most common complication of diabetes mellitus type 2 (DM2) and is associated with significant morbidity and mortality. The pathophysiological mechanisms leading to the development of DPN have not been fully studied and are still debatable. Currently, immune-mediated mechanisms of its development are being discussed. The aim of this study was to estimate the content of TNF- α in the blood serum of patients with DM2 complicated by DPN and to assess the significance of this factor in the development and progression of DPN. An open comparative study was conducted with the participation of 83 patients with DM2 of different duration. In patients with clinical manifestations of DPN and long-term course of DM2 (group 2), the level of TNF- α was significantly higher compared to patients with DM2 and duration of DPN less than 2 years, and both studied groups of patients with DM2 and DPN had a high level of TNF- α in comparison with the control group. The results obtained indicate a more aggressive immune-mediated process that develops with a longer duration of DM2 and makes a negative contribution to the functioning of the peripheral nerve fiber.

Keywords: diabetes mellitus type 2, diabetic peripheral neuropathy, tumor necrosis factor- α , TNF- α

УДК 616.8,577.1,612.8

СТРУКТУРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ МАЛЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ (ЭКЗОСОМ) И ИХ РОЛЬ В ОСУЩЕСТВЛЕНИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ФУНКЦИЙ

© 2023 г. А. М. Турчинец¹, А. А. Яковлев^{1, 2, *}

¹Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева ДЗМ, Москва, Россия

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

Поступила в редакцию 29.05.2023 г.

После доработки 30.05.2023 г.

Принята к публикации 31.05.2023 г.

Внеклеточные везикулы (ВВ) – новая и активно развивающаяся область современной экспериментальной и теоретической биологии, которая привлекает исследователей прежде всего возможностью использования ВВ в качестве диагностических биомаркеров и терапевтических агентов. В настоящее время наибольший объем данных накоплен о малых внеклеточных везикулах (мВВ) – экзосомах, везикулах эндосомального происхождения, и эктосомах (ранее известных как микровезикулы), представляющих собой продукт непосредственного отпочковывания от плазматической мембраны. В настоящем обзоре мы рассматриваем основные этапы биогенеза экзосом и эктосом, основные процессы внутриклеточного трафика мембран, а также сигналинг с участием мВВ. Также обсуждается роль мВВ в физиологии и патофизиологии нервной системы, а также многие перспективные аспекты изучения биологии мВВ.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, малые внеклеточные везикулы, экзосомы, ESCRT, SNARE, Rab-ГТФазы, сигналинг, эндолізосомальная система, мультивезикулярные тельца, мембранный трафик, межклеточное взаимодействие

DOI: 10.31857/S1027813323040222, EDN: OUFCLZ

Список сокращений

CHMP – charged multivesicular body proteins
ESCRT – endosomal sorting complex required for transport
HRS – hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
ISG-15 – interferon-stimulated gene 15
MHC – major histocompatibility complex
SNARE – soluble NSF attachment receptor
STAM – signal transducing adaptor molecule
TCR – T-cell receptor
TSG101 – tumor susceptibility gene 101 protein
V-АТФаза – вакуолярная АТФаза
Vps-4 – vacuolar protein sorting-associated protein 4
ВВ – внеклеточные везикулы
ВПП – внутрипросветные пузырьки
мВВ – малые внеклеточные везикулы

МВТ – мультивезикулярные тельца

ОАМЭ – обусловленный активностью массовый эндоцитоз

ВВЕДЕНИЕ

Внеклеточные везикулы (ВВ) – окруженные двойным слоем фосфолипидной мембраны пузырьки, секретлируемые всеми типами клеток во внеклеточное пространство. Существует несколько субпопуляций внеклеточных везикул, самыми исследованными из которых являются апоптотические тельца (размером 50–1000 нм), эктосомы (также известные как микровезикулы, размером 100–1000 нм) и экзосомы (размером 30–200 нм). Существующие в настоящее время методы выделения не всегда позволяют специфически выделить определенную популяцию ВВ, поэтому принято использовать термин малые ВВ (мВВ) для обозначения везикул размером менее 200 нм [1]. При этом мВВ различаются по своему происхождению (биогенезу), способу секреции, размеру, составу и функции. Состав мВВ (в иностранной

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

литературе широко используется термин cargo – (англ. груз) отличается широким разнообразием и зависит от многих факторов, в первую очередь от биогенеза и типа родительской клетки. Современные методы анализа позволяют выявить в составе мВВ белки (в т.ч. ферменты, рецепторы, структурные белки), липиды, нуклеиновые кислоты (ДНК, мРНК, микроРНК и др.), а также низкомолекулярные метаболиты.

Вплоть до 1980-х гг. прошлого столетия принято было считать, что секреция мВВ является способом поддержания клеточного гомеостаза и позволяет клетке избавиться от переработанных веществ [2]. В 1983 году с помощью подробных ультраструктурных исследований было выяснено, что в эритроцитах везикулы секретируются при слиянии мультивезикулярных телец (МВТ) с плазматической мембраной в процессе созревания этих клеток [3], а в 1996 г. было установлено, что везикулы, выделяемые лимфоцитами, зараженными вирусом Эпштейна–Барр, обладают антигенпрезентирующими свойствами и способны индуцировать Т-клеточный ответ [4]. Новый виток интереса к изучению мВВ произошел в 2006–2007 гг., когда было обнаружено, что в составе мВВ обнаруживаются РНК (мРНК и микроРНК) – и с тех пор мВВ стали рассматриваться как новый способ передачи эпигенетической информации между клетками [5]. Областью, в которой за последнее десятилетие были проведены самые масштабные исследования мВВ, является онкология [6], в первую очередь благодаря способности раковых клеток секретировать мВВ, которые готовят прометастатические ниши в организме [7]. Вместе с тем проведенные на данный момент исследования показали, что секреция мВВ является фундаментальным свойством всех клеток и представляет собой механизм локального и дистантного межклеточного взаимодействия, наблюдаемый не только у эукариот, но также и у бактерий и архей [8].

мВВ У БАКТЕРИЙ И АРХЕЙ

У прокариот ВВ – это единственная секреторная система, осуществляющая обмен между клетками липидов, гидрофобных или денатурированных белков, а также гидрофобных сигнальных молекул [9]. В связи с этим предложено называть этот тип секреции системой секреции нулевого типа (по аналогии с 7 изученными типами секреции) [9]. У прокариот ВВ участвуют в осуществлении многих процессов: межклеточное взаимодействие и чувство кворума, формирование биопленок, защита от токсических субстанций (в т.ч. антибиотиков), взаимодействие с эукариотическими клетками и распространение факторов вирулентности и токсинов [10–12]. Также у архей и бактерий предполагается роль ВВ в осуществле-

нии горизонтального переноса генов, в дополнение к хорошо известным механизмам трансформации, трансдукции и конъюгации [13]. Несмотря на способность клеток всех трех доменов жизни секретировать ВВ, на настоящий момент накоплено недостаточно информации о механизмах биогенеза ВВ, чтобы судить о единстве эволюционного происхождения этого феномена или его независимом формировании в различных доменах [8]. Однако в геноме многих архей закодированы и участвуют в ремоделировании мембран и репродукции вирусов гомологи ESCRT-III и Vps4 – ключевых белков, определяющих секрецию экзосом у эукариот [14], а у бактерий аналогичные функции выполняют белки PspA и Vipp1, которые также являются гомологами комплекса ESCRT-III [15]. Подробнее компоненты этой системы будут рассмотрены ниже.

Также у бактерий существуют закономерности сортировки грузов в состав ВВ. Особенно большая роль в этом процессе отведена внутриклеточному расположению белков. В частности, факторы вирулентности чаще ассоциированы с заряженными липополисахаридами, и имеют большую вероятность оказаться в составе ВВ, чем белки, ассоциированные с нейтральными липополисахаридами [16].

В классической клеточной биологии принято считать, что клетки эукариотических организмов взаимодействуют друг с другом напрямую и/или при помощи секреции во внеклеточную среду растворимых вещества – гормонов, факторов роста, цитокинов. Подобные вещества могут действовать как на секретирующую их клетку (аутокринный сигналинг), так и на соседние (паракринный сигналинг) или отдаленные клетки (эндокринный сигналинг). Получается, что ВВ представляют собой принципиально новый способ межклеточного взаимодействия, общий для эукариот и прокариот (рис. 1).

ЭКЗОСОМЫ

Экзосомы, до момента высвобождения из клетки называемые внутрисветными пузырьками (ВПП, англ. intraluminal vesicles (ILVs)), являются наиболее хорошо изученной субпопуляцией мВВ. Они секретируются всеми типами клеток и были найдены во всех биологических жидкостях – плазме крови, амниотической, синовиальной и цереброспинальной жидкостях, грудном молоке, лимфе, желчи, слезах, желудочном соке [17–19]. По своему происхождению они являются компонентами эндосомальной системы и формируются за счет впячивания мембраны ранних эндосом внутри с образованием ВПП, ранние эндосомы в течение этого процесса созревают в МВТ. Эти органеллы играют важную роль в осуществлении эндоцитоза и внутриклеточном трафике мем-

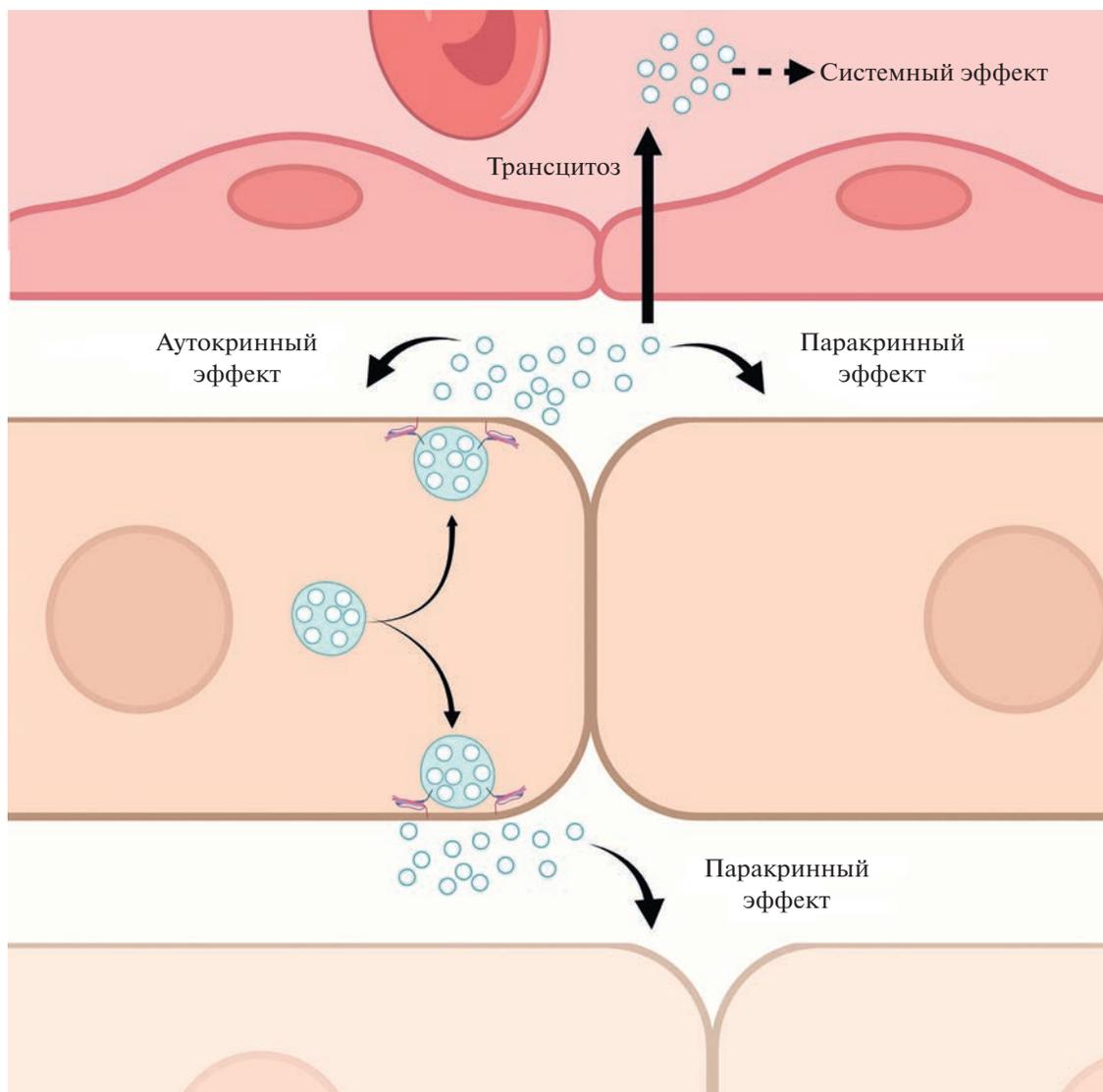


Рис. 1. На рисунке представлены способы межклеточного взаимодействия с участием экзосом. Будучи секретированы клеткой во внеклеточную среду, экзосомы могут воздействовать на материнскую клетку (аутокринный эффект) и соседние клетки в пределах ткани (паракринный эффект), а также проникать в кровоток и переноситься с кровью, оказывая системное воздействие.

бранных компонентов и сортировке, переработке и транспорте белков. После созревания МВТ либо сливаются с лизосомой, что приводит к расщеплению их содержимого, либо сливаются с плазматической мембраной клетки, высвобождая во внеклеточное пространство ВПП в виде экзосом [20].

До сих пор достоверно не установлены факторы, определяющие судьбу МВТ, однако проведено несколько исследований, показывающих, что МВТ с высоким содержанием холестерина с большей вероятностью сливаются с плазматической мембраной, в то время как обедненные холестерином МВТ чаще деградируют путем слияния с лизосомами [21, 22]. В регуляции формирования МВТ и экзосом ключевую роль играют белки сор-

тировочного комплекса эндосом, необходимого для транспорта – ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) [23–25]. Также на этот процесс большое влияние оказывают ростовые факторы, которые, уменьшая активность PI3K III класса и синтез фосфатидилинозитола-3-фосфата, предотвращают замену Rab5 на Rab7 на мембране везикулы и слияние эндосом с лизосомами, тем самым стимулируют секрецию экзосом [26].

МВВ В МЕЖКЛЕТОЧНОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИИ

Множество функций, сопряженных с мВВ, прежде всего, экзосомами, ставит сигналинг с их участием в один ряд с фундаментальными физио-

логическими процессами. В сравнении с живой клеткой, разнообразие молекул в составе ВВ (белков, липидов, нуклеиновых кислот) невелико, однако они оказывают значительное функциональное воздействие на клетки-акцепторы. Предполагается, что это возможно благодаря селективному и эффективному взаимодействию и особыми механизмами передачи сигнала [27].

Ключевую роль во взаимодействии экзосом с клеткой-акцептором, а также в поглощении и осуществлению биологических функций, играет химический и молекулярный состав внешней поверхности липидной мембраны экзосом – или ее “биокороны”. Состав этой короны уникален и представляют собой структуры родительской клетки, полученные в процессе биогенеза, а также приобретенные в процессе электростатического взаимодействия с внеклеточной средой (в т.ч. плазмой крови) молекулы [28, 29]. Предполагается, что именно уникальный состав биокороны определяет специфичность взаимодействия экзосомы с клетками-акцепторами, биораспределение и характеристики мобильности экзосом. Кроме того, поверхностные детерминанты представляют интерес в качестве мишеней для идентификации, классификации экзосом и их аффинной хроматографии [28, 29].

В патологических условиях секреция экзосом из поврежденных клеток нередко увеличивается, и экзосомы приобретают некоторые характеристики, свойственные протекающему патологическому процессу. Немалый объем данных накоплен о роли экзосом в патогенезе неврологических и психиатрических заболеваний, в частности, при болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона, боковом амиотрофическом склерозе, депрессии, шизофрении и многих других [30–35]. Особый интерес в данном контексте представляет способность экзосом проникать через гематоэнцефалический барьер в двух направлениях, что делает экзосомы перспективным объектом исследования в качестве неинвазивного биомаркера заболеваний (“liquid biopsy”) и возможного механизма адресной доставки терапевтических средств [36].

Таким образом, молекулярный состав экзосом зависит от биогенеза, типа клетки-донора и ее состояния. Поскольку в процессе формирования экзосомы образуются путем инвагинации из цитозоля, в отличие от других процессов, обеспечивающих трафик мембраны между компартаментами клетки, ориентация их мембраны аналогична плазматической мембране – снаружи оказываются внеклеточные домены трансмембранных белков, и компоненты цитозоля – внутри [37].

БИОГЕНЕЗ мВВ

Кратко рассмотрим основные этапы биогенеза, транспортировки и доставки экзосом, для того чтобы лучше понять функциональную значимость структур поверхности экзосом.

ESCRT. Эндосомальный комплекс сортировки, необходимый для транспорта (ESCRT) – семейство белков, которые последовательно собираются в комплексы (ESCRT-0, I, II и III) на мембране МВТ и регулируют поступление груза в состав ВПП и их формирование [38]. Интересно отметить, что недавние работы показали, что белки-предшественники комплекса ESCRT-III – преимущественно семейства CHMP (charged multivesicular body proteins, заряженные белки мультивезикулярных телец) – находятся в комплексе с мембранами эндосом и полимеризуются под воздействием комплекса ESCRT-II, приобретая функциональную активность [39]. Белок Alix может напрямую катализировать полимеризацию CHMP, без участия ESCRT-I, II, фактически являясь их функциональной заменой [40].

Присутствие белка гена чувствительности к опухолям 101 (TSG101) и других белков комплекса ESCRT или сопутствующих молекул, например, Alix и связанного с вакуолярным белком сортировки белка 4 (vacuolar protein sorting-associated protein 4 – Vps4), в мВВ часто оценивают как доказательство их эндосомального происхождения. Тем не менее, комплекс ESCRT задействован и в других внутриклеточных процессах трафика мембраны, кроме компонентов ESCRT-0, участие которых не описано в моделях выпячивания и отшнуровки мембран. Поэтому именно зависимость секреции мВВ от ESCRT-0 является более надежным свидетельством их эндосомального происхождения. Это подтверждается в исследовании Colombo и соавт. в 2013 на клетках линии HeLa, показавших, что выключение компонентов ESCRT-0 (HRS и STAM1) приводит к уменьшению секреции мВВ, несущих CD63 и CD81, ответствующих экзосомам [41].

HRS связывается с убиквитинированными белками, чтобы направить их во ВПП [38]. Однако лишь присутствия убиквитинированных белков в составе мВВ недостаточно, чтобы делать утверждение об их эндосомальной природе [42], поскольку не доказано отсутствие подобных белков в везикулах, образующихся путем отшнуровки от плазматической мембраны напрямую, т.е. в эктосомах. Наоборот, воздействие на клетки интерферонов 1 типа приводит к связыванию клеточных белков с подобной убиквитину молекулой ISG-15, которая в свою очередь способствует слиянию МВТ с лизосомой, и тем самым приводит к уменьшению секреции экзосом [43]. Однако, необходимо помнить, что одной из ключевых мишеней ISG15 является TSG101, который

участвует и в формировании эктосом плазматической мембраны [44], и поэтому связанное с ISG-15 уменьшение секреции везикул может быть специфично не только для экзосом.

Результаты последних исследований свидетельствуют о том, что не существует единой молекулы, которая бы определяла сортировку груза по ESCRT-зависимому пути, так как присоединение к любому компоненту каждого из четырех комплексов ESCRT вне зависимости от убиквитина может привести к сортировке в состав ВПП, и это прежде всего определяется силой взаимодействия груз-мембрана-ESCRT [45]. Кроме того, показано, что ни один из убиквитин-связывающих доменов в составе комплексов ESCRT не является необходимым для сортировки грузов [46].

Достоверно известно, что некоторые белки включаются в состав MBT по ESCRT-независимому пути. В клетках дрожжей интегральный мембранный белок Cvt17/Aut5p и белок Sna3p поступают в MBT независимо от убиквитинирования [47], а бета цепь рецептора к интерлейкину 2 (IL2-Rb) сортируется в состав экзосом, присоединяясь к HRS вне мотива, взаимодействующего с убиквитином [48]. Белки с KFERQ-мотивом (например, фактор, индуцируемый гипоксией 1-альфа (HIF1A), и α -синуклеин) включаются в состав экзосомального груза при участии LAMP2A и шаперона HSC70. Другими словами, некоторые механизмы сортировки груза во ВПП очень похожи на механизмы шаперон-опосредованной аутофагии и эндосомальной микроаутофагии, и по похожему механизму происходит сортировка во ВПП с участием белков Alix, CD63, синтенина, Rab31, а также церамида [49, 50].

Липиды. Почкование пузырьков из цитозоля происходит при участии липидов, таких как церамид, который образуется под действием сфингомилиназы из сфингомиелина. Ингибирование нейтральной сфингомилиназы (nSMase-2) приводит к нарушению формирования ВПП в MBT и сокращению секреции экзосом по ESCRT-независимому пути [51]. Несмотря на то, что не до конца ясна роль сфингомилиназы в формировании других типов мВВ, использование агентов, ингибирующих нейтральную сфингомилиназу (GW4869), и прицельная РНК-интерференция nSMase-2 часто используется для доказательства экзосомальной природы мВВ или указывает на связь с экзосомами того или иного биологического эффекта. Однако обязательно стоит упомянуть, что нарушение образования церамида ведет к изменению многих клеточных функций [52]. Так, при воздействии GW4869 отмечается компенсаторное увеличение секреции микровезикул большего размера [53]. Также nSMase влияет на весь мембранный трафик после комплекса Гольджи, таким образом, предположительно и на лю-

бую секрецию вообще [54]. Церамид также регулирует процессы аутофагии [55], и воздействие на него может косвенно приводить к нарушению гомеостаза MBT. В целом, для интерпретации влияния тех или иных агентов или модуляции активности генов на секрецию мВВ, необходимо также учитывать их влияние на другие клеточные процессы, в первую очередь процессы клеточной гибели и аутофагии.

У *Caenorhabditis elegans* экстернализация фосфатидилэтаноламина, который в норме удерживается на цитозольном листке мембраны ферментом флиппазой, ведет к почкованию и отшнуровке мВВ [56]. В клетках млекопитающих потеря мембранной асимметрии фосфатидилсерина и фосфатидилэтаноламина также ведет к почкованию пузырьков, в этом процессе задействованы два семейства транслоказ со скрамблазной активностью [57], но влияние этих процессов на секрецию экзосом не установлено.

Синдекан и синтенин. Специфическое направление трансмембранных белков в состав ВПП может происходить в результате белок-белковых взаимодействий [58]. Синтенин-1 и синдекан-1 обнаруживаются в экзосомальных фракциях. Взаимодействие синтенина-1 с цитозольным доменом синдекана-1 привлекает Alix, который вместе с белками комплексов ESCRT-I и -III способствует почкованию ВПП. Этот процесс основан на Src-зависимом эндоцитозе синдекана-1 [59], и требует активности фосфолипазы D2 и ГТ-Фазы фактора АДФ-рибозилирования 6 (ARF6) [60]. Однако сомнительна специфичность этого процесса для экзосом всех клеток. Так, в дендритных клетках и адипоцитах, синтенин в большинстве своем присутствует в мВВ, соответствующих по характеристикам экзосомам, но обнаруживается и в более крупных везикулах [61]. Более того, ARF6 задействован в секреции опухолевыми клетками крупных внеклеточных везикул [62]. Таким образом, ARF6 может принимать участие в секреции разных типов мВВ (рис. 2).

Закисление MBT. По мере созревания MBT закисление их внутренней среды необходимо для слияния MBT с лизосомами, последующего расщепления и переработки поглощенных компонентов [63]. Ключевую роль в закислении MBT играет H^+ -АТФаза вакуолярного типа (V-АТФаза): мультисубъединичный комплекс, образованный трансмембранным протон-транспортирующим каналом (V_0) и цитоплазматическим немембранным АТФ-гидролизующим комплексом (V_1) [64]. В настоящее время накоплен немалый объем знаний о многоуровневой регуляции функции V-АТФазы и ее влиянии на секреторные процессы, в частности на секрецию синаптических везикул [65, 66].

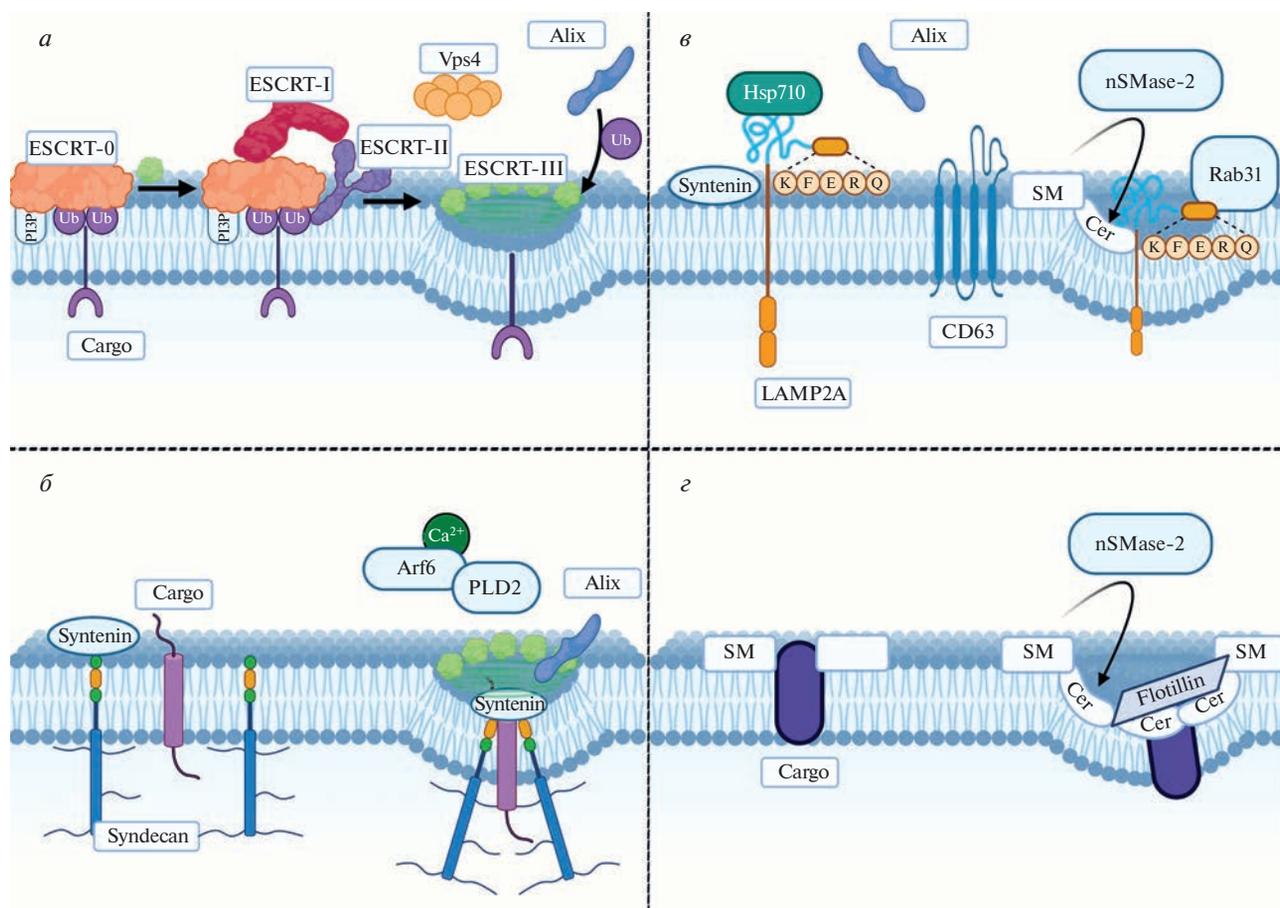


Рис. 2. На рисунке представлены ESCRT-зависимые (*a, б*) и ESCRT-независимые (*в, з*) способы биогенеза ВПП и их загрузки (cargo loading).

(*a*) При классическом ESCRT-зависимом сортировке к убиквитинированному белку последовательно присоединяются комплексы ESCRT-0, ESCRT-I и ESCRT-II, формируется начальная кривизна мембраны. Под воздействием ESCRT-I, II белки комплекса ESCRT-III, находящиеся на поверхности эндосом, начинают полимеризоваться сначала в плоскую спиральную структуру, а затем в объемную коническую спираль, формирующую инвагинацию мембраны. Связывающийся с убиквитином белок Alix может индуцировать полимеризацию комплекса ESCRT-III независимо от ESCRT-I, II. АТФаза Vps4 обеспечивает привлечение новых субъединиц ESCRT-III и окончательную отшнуровку пузырька, а также деполимеризацию ESCRT-III после формирования ВПП.

(*б*) При взаимодействии синдекана с синтенином происходит независимая от ESCRT кластеризация груза (без участия убиквитина и ESCRT-0) и инвагинация мембраны при участии фосфолипазы D2 и ARF6, а также привлекается Alix, который участвует в полимеризации ESCRT-III и отшнуровке ВПП.

(*в*) Белки, содержащие KFERQ-мотив, направляются в состав ВПП при участии белка мембраны LAMP2A и шаперона Hsp70. В формировании ВПП в данном случае участвуют CD63 (который способен формировать тетраспаниновые домены, обеспечивающие инвагинацию мембраны), Rab31 и церамид.

(*з*) Основной ESCRT-независимый механизм формирования ВПП реализуется за счет церамида, образующегося на мембранах путем гидролиза сфингомиелина нейтральной сфингомиелиной-2. Церамид способен формировать липидные рафты, которые за счет физических свойств обеспечивают спонтанное выпячивание мембраны и формирование ВПП.

Регуляция функции V-АТФазы имеет большое значение в определении развития MBT по деградационному или секреторному пути. Guo и соавт. (2017) обнаружили, что белки аутофагии Atg5 и Atg16L147 приводят к диссоциации E1-субъединицы V₁-АТФазы, уменьшению закисления MBT и увеличению секреции экзосом в клетках человека. Показано, что эти белки действуют независимо от Atg7 и классического каскада макроаутофагии. Это происходит благодаря следующей

последовательности событий: Atg5, в большом количестве находящийся на мембранах MBT, участвует в упаковке LC3 в состав ВПП, а LC3 в свою очередь связывает E1 субъединицу V₁-АТФазы и также увлекает ее в состав экзосом, нарушая функцию переносчика протонов V₁-АТФазы и приводя к повышению pH MBT [67].

В 2019 г. Latifkar и соавт. сообщили о роли сиртуина 1 (SIRT1) в регуляции функции V-АТФазы: сиртуин 1 увеличивает стабильность мРНК

A-субъединицы V_1 -АТФазы, тем самым увеличивая закисление поздних эндосом и лизосом. Соответственно, снижение экспрессии сиртуина 1 ведет к увеличению секреции экзосом, причем в таких экзосомах обнаруживается большое количество убиквитинированных белков [68]. Сиртуины – ферменты, чье участие в процессах выживания клеток известно достаточно давно, известно, что их экспрессия снижается с возрастом. Возможно, снижением экспрессии сиртуинов можно объяснить увеличение количества экзосом в образцах крови людей старшего возраста.

В своей недавней работе Choezom и соавт. (2022) показали, что на функцию V-АТФазы также влияет и nSMase-2. V-АТФаза на эндосомальных мембранах располагается в рафт-подобных доменах, обогащенных сфингомиелином и холестерином, и ультраструктурные исследования с применением криоэлектронной микроскопии показали, что организованные в определенном порядке липиды (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, холестерин) являются интегральной частью V_0 комплекса и играют важнейшую роль в сборке и регуляции функционирования V-АТФазы [69]. nSMase-2 гидролизует сфингомиелин с образованием церамида, который, совместно с холестерином, провоцирует инвагинацию мембраны для формирования ВПП, и увлекает субъединицы V-АТФазы с собой, тем самым препятствуя дальнейшему закислению просвета МВТ и способствуя секреции экзосом [70].

Таким образом, предполагается важная роль pH в определении развития судьбы МВТ по секреторному или деградационному пути. В некоторых случаях, pH является определяющим фактором в осуществлении экзосомами физиологических функций: экзосомы, несущие неактивный pH-чувствительный TGF β -1, активируются в кислой эндосомальной среде и приобретают возможность индуцировать фенотипические изменения в клетках-акцепторах [71].

Кроме того, существует множество доказательств того, что V-АТФаза, помимо функции переносчика протонов, непосредственно участвует и в процессах экзоцитоза и секреции [66]. Это продемонстрировано в работе Роёа-Guyon и соавт. (2013) на секреторных гранулах клеточной линии PC12. При достижении определенной концентрации протонов в просвете гранулы комплексы V_1 и V_0 диссоциируют, благодаря чему V_0 оказывается доступной к взаимодействию с другими белками – ARNO-ARF6 и SNARE, определяя секрецию. При фармакологической блокаде закисления нигерицином или хлоридом аммония прочность ассоциации V_1 и V_0 увеличивается, и секреция сокращается. Однако при диссоциации субъединиц с использованием бафиломицина за-

кисление просвета прекращается, но секреция не останавливается. Таким образом, авторами был сделан вывод, что V_0 субъединица служит одновременно сенсором кислотности в просвете везикулы и адаптером для последующих ступеней секреторного пути, однако точные механизмы, стоящие за этими функциями, пока неясны [72].

ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ ТРАФИК И СЕКРЕЦИЯ ЭКЗОСОМ И МВВ

Молекулы внутриклеточного трафика, которые осуществляют адресное перемещение МВТ и их слияние с плазматической мембраной, также могут использоваться для дифференциации экзосом от эктосом, происходящих из цитоплазматической мембраны.

Малые ГТФазы Rab. Члены семейства малых ГТФаз Rab играют доказанную роль в перемещении пузырьков между клеточными компартментами [73] и также могут быть вовлечены в перемещение МВТ к плазматической мембране и секрецию экзосом. Центральную роль в этом процессе играет механизм Rab5/Rab7 конверсии, который определяет превращение ранних эндосом в поздние и их слияние с лизосомами [74]. Предотвращение конверсии Rab5/Rab7 ведет к увеличению секреции экзосом. В частности, Wei и соавт. было показано, что Rab31, будучи активированным рецептором эпидермального фактора роста, привлекает эффекторные белки, которые инактивируют Rab7 [75]. В недавней работе Verweij и соавт. показали, что в секреции CD63-позитивных экзосом играет роль еще один каскад конверсии Rab: Rab7a-Arl8b-Rab27a – который происходит в области мембранных контактов эндоплазматического ретикулума и поздних эндосом/мультивезикулярных телец [76].

Известно, что повреждение Rab27a или Rab27b приводит к изменению морфологии МВТ и нарушает их состыковку с плазматической мембраной [77]. Также была показана роль Rab35 в секреции экзосом олигодендроцитами [78]. Rab11 также участвует в биогенезе МВТ и их стыковке с плазматической мембраной, при этом его функция находится в тесной взаимосвязи с внутриклеточным уровнем кальция и, по-видимому, является специфичной для клеток определенных типов [79, 80].

Интересно, что Rab35 и компоненты комплекса ESCRT (прежде всего Alix) также ответственны за обусловленный активностью массовый эндоцитоз (ОАМЭ, activity dependent bulk endocytosis – ADBE), который является необходимым для образования синаптических пузырьков, и рециркуляции пресинаптических белков [81, 82]. Это подтверждается повышением иммунореактивности Alix в пресинаптических компартментах си-

напсов, находящихся в состоянии высокочастотной активации при эпилептических приступах [83].

Помимо своей роли в переработке белков (в частности рецептора к трансферрину), Rab11 в настоящее время рассматривается как один из важнейших участников эндосомального трафика в нервных клетках. Rab11 осуществляет плейотропные функции, в том числе модулирует эффективность синаптической передачи (предположительно за счет взаимодействия с эпсилон-субъединицей V-АТФазы [84]), участвует в транспорте многих важных для развития и регенерации нервных клеток молекул (АМРА-рецепторы, интегрин, Trk, протрудин [85, 86]), благодаря чему играет важную нейропротективную роль при многих нейродегенеративных заболеваниях [87].

SNARE. ГТФазы Rab могут действовать на слишком ранних или неспецифических этапах внутриклеточного транспорта, чтобы их можно было использовать для модулирования секреции экзосом. Поэтому главной задачей в изучении биогенеза экзосом является установление специфических комплексов SNARE, ответственных за слияние мембраны МВТ с плазматической мембраной. На настоящий момент показано, что YKT6 SNARE необходим для секреции Wnt-позитивных экзосом [88], а Sux-5, гомолог синтаксина-5 *C. elegans*, направляет МВТ к плазматической мембране при участии малой ГТФазы Ral-1 [89]. Однако оба этих белка участвуют в трафике мембран от ЭПР к комплексу Гольджи, поэтому их ингибирование также связано с нарушением обычных секреторных путей. Также было показано, что специфичный для нейронов белок SNARE синтаксин-1A, участвующий в секреции синаптических пузырьков, влияет на секрецию экзосом у дрозофил [90]. На клетках линии HeLa, ассоциированный с плазматической мембраной SNARE SNAP-23, опосредует слияние МВТ с плазматической мембраной спонтанно и после воздействия гистамина [91]. Эти белки участвуют в процессах слияния в непосредственной близости от плазматической мембраны, и потому могут быть не задействованы в обычном внутриклеточном трафике мембранных компонентов, тем не менее, они могут быть вовлечены в процессы секреции из секреторных гранул.

Цитоскелет. Для почкования и отшнуровки ВВ необходима полимеризация актина под плазматической мембраной и сокращение актомиозинового комплекса [92], регулируемое малыми ГТФ-азами RhoA. Однако состояние актинового пула вокруг МВТ и его влияние на формирование ВПП не исследовалось. Нельзя исключать, что для слияния МВТ с плазматической мембраной и выброса экзосом необходима локальная деполимеризация кортикального актина. Таким образом, можно предположить, что воздействие на

актин косвенно увеличивает секрецию экзосом. Предполагается, что для транспорта МВТ к плазматической мембране требуется участие системы микротрубочек [93]. Ее повреждение ведет к уменьшению секреции экзосом, но также воздействует на другие мембранные компартменты [94]. Поэтому мембранные компоненты могут использоваться для различения экзосом и эктосом, но воздействие на них также могут привести к множеству неспецифических эффектов (рис. 3).

БИОЛОГИЯ ПОГЛОЩЕНИЯ ВВ И ОСУЩЕСТВЛЕНИЕ ИМИ ФУНКЦИЙ

Высокий интерес исследователей к ВВ обусловлен их способностью вызывать фенотипические изменения в клетках-акцепторах. Различия в размере и структуре ВВ могут оказывать влияние на их распознавание и поглощение клетками-мишенями. Например, микропиноцитоз совместим с захватом отдельных мВВ, но не с крупными ВВ или агрегатами мВВ [95].

Предложено несколько схем взаимодействия ВВ с клетками-акцепторами. Это слияние с целевой клеткой и высвобождение содержимого ВВ в цитоплазме, воздействие лигандов на поверхности ВВ на рецепторы клетки-акцептора (kiss-and-run) и разрушение ВВ в непосредственной близости к мембране клетки-акцептора с последующим воздействием содержимого ВВ на рецепторы клетки. Например, при осуществлении иммунного ответа, ВВ, несущие на себе молекулы МНС, могут активировать TCR на поверхности Т-лимфоцитов [96]. ВВ могут быть поглощены клеткой и направлены на деградацию в лизосомы или переработаны и вновь секретированы во внеклеточное пространство. Такой тип показан на клетках рака молочной железы: поглощенные CD81-позитивные экзосомы фибробластов внутри клеток связываются с Wnt11 и повторно секретированы, тем самым стимулируя подвижность находящихся рядом раковых клеток по Wnt-зависимому пути [97].

Однако главное свойство ВВ — способность заключать молекулы в состав пузырька с липидным бислоем и переносить их на расстоянии. Несколько исследований показывают роль ВВ в прогрессировании онкологических заболеваний, например, путем обмена РНК между клетками глиобластомы и эндотелием [98], онкогенными ДНК и ретротранспозонами, между клетками медуллобластомы и эндотелием [98], а также путем обмена белками, как например рецептором эпителиального фактора роста вариант III (EGFRvIII) между клетками глиомы [99].

Роль ВВ в обмене белками показана в нервной системе, где опосредованный ВВ перенос белка синаптоагмина 4 из пресинаптических клеток к

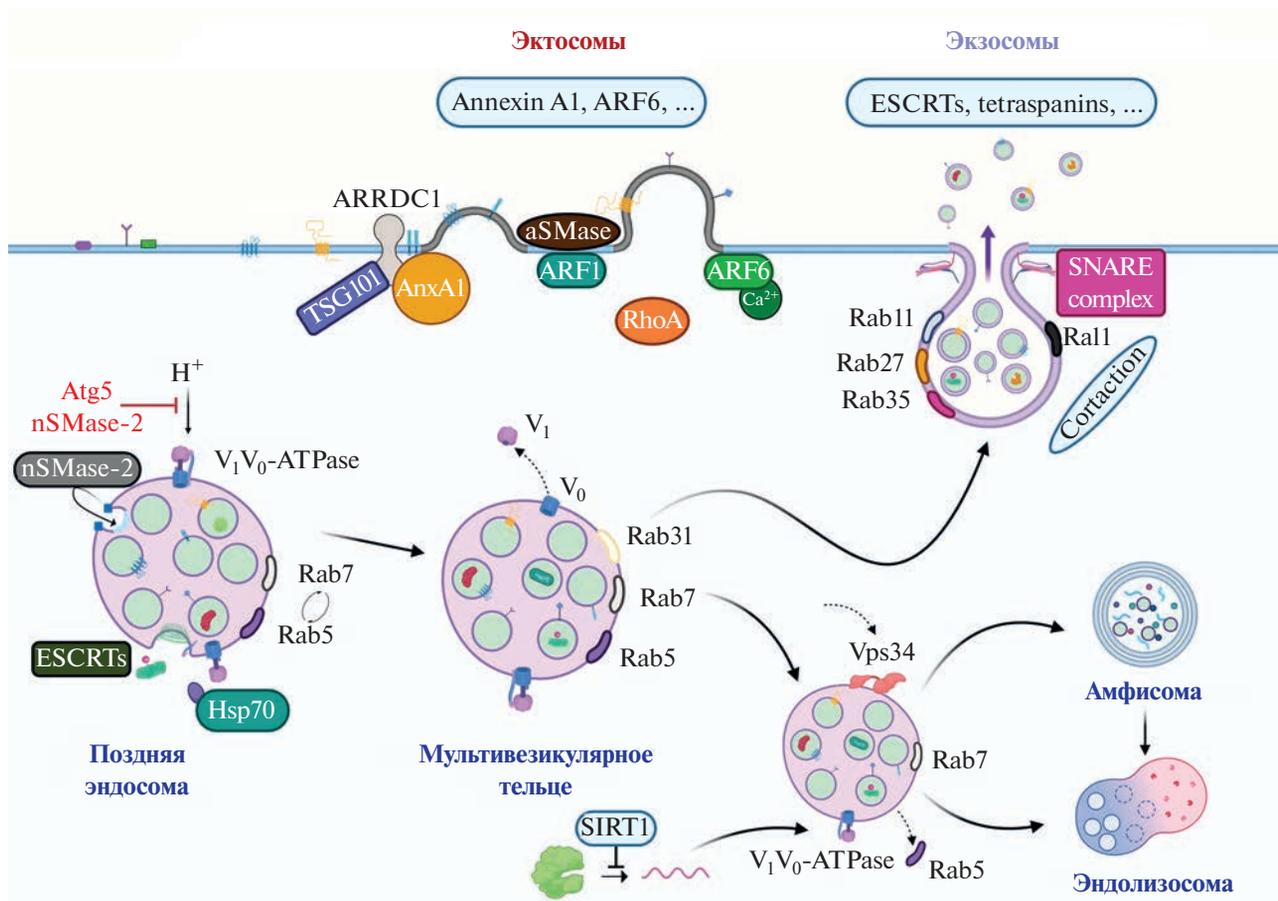


Рис. 3. На рисунке представлены основные участники биогенеза, внутриклеточного трафика и секреции экзосом и эктосом. Центральную роль в определении судьбы мультивезикулярных телец играет механизм Rab5/Rab7 конверсии: Rab7-позитивные MBT с большей вероятностью оказываются направлены на деградацию, тогда как предотвращение смены Rab5 на Rab7 (в частности, при участии Rab31) определяет секрецию. Не менее важное значение играет pH MBT, который в первую очередь обеспечивает V-АТФаза. Atg5 и нейтральная сфингомиелиназа-2 приводят к снижению активности V-АТФазы, что уменьшает закисление MBT и способствует секреции экзосом. Сиртуин 1, напротив, увеличивает стабильность мРНК V-АТФазы и способствует закислению MBT и их направлению на деградацию. В стыковке MBT с плазматической мембраной важную роль играют малые ГТФазы Rab11, 27, 35, а также комплекс SNARE. Эктосомы формируются путем прямого отщуривания от плазматической мембраны при участии TSG-101 (компонент ESCRT-комплекса), Аннексина A1, ГТФаз ARF1 и ARF6, кислой сфингомиелиназы и других молекул.

постсинаптическим обеспечивает ретроградный контроль пресинаптической активности [100], а постсинаптические нейроны секретируют экзосомы, содержащие GluR2,3 субъединицы AMPA-рецептора (но никогда – субъединицы NMDA-рецептора) и синаптобревин, необходимый для высвобождения нейромедиатора из синаптического пузырька – предполагается, что благодаря этому возможно быстрое возобновление в пресинаптических нейронах пула белков, необходимых для секреции [101, 102]. В дополнение, при опосредовании ВВ может происходить обмен между моноцитами и эндотелиальными клетками хемокиновым рецептором CCR5, который необходим для передачи и распространения ВИЧ-1, что приводит к проникновению вируса в клетки, изна-

чально лишенные машинерии для его воспроизведения [103].

Механизмы поглощения ВВ и доставки их грузов в цитозоль клеток-акцепторов по-прежнему описаны не полностью. Первый шаг в этом процессе состоит в “наведении” ВВ на клетку-акцептор. До сих пор вопрос о том, обусловлена ли специфичность воздействия типом клеток или субпопуляцией ВВ, или этот процесс является неспецифическим и стохастическим, остается нерешенным, и в литературе можно найти подтверждения обоим этим гипотезам.

Например, олигодендроцитарные мВВ поглощаются преимущественно микроглией, а не нейронами. мВВ первичных нейронов захватываются только другими нейронами [104], а мВВ нейробластомы в равной степени связываются с

астроцитами [102]. В то же время показано, что при повышенном уровне глутаматергической трансмиссии в соседних к активным нейронам олигодендроцитах повышается уровень Ca^{2+} и увеличивается секреция экзосом, которые селективно связываются с нейронами и оказывают нейропротекторный эффект, внося вклад в аксональный гомеостаз и регуляцию нейропластичности [105].

Напротив, клетки линии HeLa способны связывать большой набор ВВ, продуцируемых различными клетками [106], что справедливо и для многих других клеток, что было показано в исследованиях с липофильными красителями и флуоресцентным CD63 [107]. Более того, возможен и межвидовой обмен ВВ — между мышинными клетками и человеческими [5]. Тем не менее, нельзя исключить возможность существования специфического механизма захвата, обусловленного типом клетки и субпопуляцией ВВ. CD47, ассоциированный с интегринами белок, который защищает клетки от фагоцитоза, часто можно обнаружить на поверхности ВВ, что увеличивает время их циркуляции в крови и защищает от фагоцитоза моноцитами и макрофагами [108]. Таким образом, возможно наведение ВВ может быть достигнуто по механизму отрицательной селекции. Идентификация других подобных компонентов на разных типах ВВ может дать возможность разработки новых моделей и способов применения ВВ.

Второй шаг — точка входа в клетку-акцептор. Большинство исследований свидетельствуют об интернализации ВВ, однако происходит ли это неспецифическим путем (макро или микропиноцитоз) или посредством специфического рецептор-зависимого взаимодействия, неясно. Предполагается роль различных молекул на поверхности ВВ и клеток-акцепторов — интегринов, лектинов/протеогликанов, Т-клеточных иммуноглобулинов и муцинов домен-содержащего белка 4 (Tim4) — в процессе поглощения, а, значит, они могут влиять и на специфичность наведения [7, 109, 110]. Однако ни один из этих компонентов не является достаточным и необходимым условием для поглощения ВВ. Различные субпопуляции ВВ несут на своей поверхности одинаковые поверхностные белки и, вероятно, один из них играет роль лиганда для рецептора, обеспечивающего интернализацию, аналогично механизму захвата липопротеинов низкой плотности [111].

Третий — и последний — шаг заключается в доставке содержимого ВВ в клетку-акцептор. Первый очевидный вариант — слияние ВВ с плазматической мембраной. Этот путь наиболее вероятен для экзосом, которые способны переносить ДНК [112], поскольку они имеют слишком большой размер, чтобы быть интернализированными,

а также очень близкий по свойствам состав мембраны. Однако большинство публикаций на эту тему свидетельствуют об интернализации ВВ перед высвобождением груза. В таком случае ВВ сначала оказывается в составе эндосомы, а слияние их мембран происходит в процессе снижения рН [113]. Также описаны некоторые неожиданные механизмы доставки груза, например, прямую в ядро путем слияния с ними содержащих ВВ эндосом [114, 115].

ПОВЕРХНОСТНЫЕ БЕЛКИ ЭКЗОСОМ (ПРОТЕОСТЕМА, ЭПИПРОТЕОМ)

На поверхности экзосом располагаются белки разных функциональных классов, они могут быть интегральными или периферическими. Интегральные белки могут иметь несколько трансмембранных доменов, а периферические белки взаимодействуют с поверхностью мембраны путем нековалентных взаимодействий с интегральными белками или электростатического взаимодействия с гидрофильными головками фосфолипидов наружного слоя мембраны. Вся совокупность периферических поверхностных белков для удобства стоило бы назвать одним словом, например, протеостема (т.е. белковая корона). В целом, поверхностные белки экзосом — это тетраспанины (CD9, CD63, CD81) [116] белки транспорта/слияния (аннексин, флотиллин, Rab ГТФ-азы), антиген презентрующие белки, интегрины, молекулы клеточной адгезии, рецепторы (рецепторы ростовых факторов, цитокинов, сигнальных путей, липопротеинов [117]), шаперонины, гепарин-связывающие белки, ферменты, факторы свертывания крови, белки связывающие нуклеиновые кислоты и иммуноглобулины [118, 119]. Поверхностные белки отражают природу и состояние клетки-донора, а также позволяют различать субпопуляции ВВ [119, 120]. Среди маркеров экзосом клеток нервной системы достаточно широко изучены NCAM и L1CAM (CD171) (для нейронов) и GLAST (для астроцитов) [121–123]. Известно, что рецептор-опосредованный транцитоз экзосом через ГЭБ зависит от трех типов рецепторов: рецептора трансферрина, рецептора инсулина и рецептора липопротеинов низкой плотности — которые находятся на апикальной мембране эндотелиоцитов, обращенной в просвет капилляров [36].

Поверхностные и внутренние белки экзосом различаются по составу: поверхностные белки на 51.1% состоят из цитоплазматических белков и на 16.8% из ядерных белков (вдвое больше, чем внутренние белки — 8.3%). Предполагается, что поверхностные белки на экзосомах выполняют те же функции, которые они выполняют на плазматической мембране клеток, особенно если их ориентация относительно мембраны совпадает [124]. Однако было показано, что почти треть поверхностных белков экзосом имеют обратную

ориентацию, по сравнению с белками плазматической мембраны. Это может значительно влиять на результаты широко используемых методов иммунной маркировки (антительные микрочипы, конфокальная иммуофлуоресценция, проточная цитометрия и др.) и исказить их. Кроме того, определение поверхностных белков затрудняется их гидрофобностью, гетерогенностью и относительно малой представленностью, по сравнению с внутренними белками, что приводит к их вытеснению из общей протеомной картины.

В настоящее время наиболее надежное определение поверхностных белков достигается путем масс-спектрометрии [125]. Предложено несколько способов пробоподготовки для обогащения фракции мембранных белков в пробах для проведения масс-спектрометрии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Секреция внеклеточных везикул является эволюционно древним, наблюдаемым как у эукариот, так и у бактерий и архей, механизмом, который тесно взаимосвязан со многими другими фундаментальными процессами в клетке. Все процессы биогенеза ВВ строго и на многих уровнях регулируются. В настоящее время наибольшее внимание научного сообщества приковано к малым внеклеточным везикулам, в частности к экзосомам, благодаря их уникальным свойствам, которые делают экзосомы многообещающим предметом для изучения в качестве диагностического и терапевтического агента. Можно даже говорить о выделении отдельного направления современной биологии – везикуломики.

Несмотря на то, что машинерия биогенеза мВВ во многом пересекается с компонентами хорошо известных процессов и в последние годы появляется множество исследований, проливающих свет на те или иные аспекты биологии везикул, нам по-прежнему мало известно о строго специфических для них структурных и функциональных детерминантах, особенностях разных популяций везикул и везикул разного клеточного происхождения. Для того, чтобы лучше понять функции мВВ, мы считаем совершенно необходимым идентификацию их структурных детерминант, обуславливающих реализацию физиологического ответа в клетках-акцепторах.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке РФФ, проект № 23-25-00011.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность коллективу лаборатории функциональной биохимии нервной системы Института высшей нервной деятельности и нейрофи-

зиологии РАН за постоянное обсуждение актуальных вопросов современной везикуломики.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thery C., Witwer K.W., Aikawa E., Alcaraz M.J., Anderson J.D., Andriantsitohaina R., Antoniou A., Arab T., Archer F., Atkin-Smith G.K. et al. // *J. Extracell. Vesicles*. 2018. V. 7. № 1. P. 1535750.
2. Harding C., Heuser J., Stahl P. // *J. Cell Biol.* 1983. V. 97. № 2. P. 329–339.
3. Johnstone R.M., Adam M., Hammond J.R., Orr L., Turbide C. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 19. P. 9412–9420.
4. Raposo G., Nijman H.W., Stoorvogel W., Leijendekker R., Harding C., Melief C.J.M., Geuze H.J. // *J. Exp. Med.* 1996. V. 183. № 3. P. 1161–1172.
5. Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J.J., Lötvall J.O. // *Nat. Cell Biol.* 2007. V. 9. № 6. P. 654–659.
6. Nakano I., Garnier D., Minata M., Rak J. // *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2015. V. 40. P. 17–26.
7. Hoshino A., Costa-Silva B., Shen T.L., Rodrigues G., Hashimoto A., Tesic Mark M., Molina H., Kohsaka S., Di Giannatale A., Ceder S., Singh S., Williams C., Soplod N., Uryu K., Pharmed L., King T., Bojmar L., Davies A.E., Ararso Y., Zhang T., Zhang H., Hernandez J., Weiss J.M., Dumont-Cole V.D., Kramer K., Wexler L.H., Narendran A., Schwartz G.K., Healey J.H., Sandstrom P., Labori K.J., Kure E.H., Grandgenett P.M., Hollingsworth M.A., de Sousa M., Kaur S., Jain M., Mallya K., Batra S.K., Jarnagin W.R., Brady M.S., Fodstad O., Muller V., Pantel K., Minn A.J., Bissell M.J., Garcia B.A., Kang Y., Rajasekhar V.K., Ghajar C.M., Matei I., Peinado H., Bromberg J., Lyden D. // *Nature*. 2015. V. 527. № 7578. P. 329–335.
8. Gill S., Catchpole R., Forterre P. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2019. V. 43. № 3. P. 273–303.
9. Guerrero-Mandujano A., Hernández-Cortez C., Ibarra J.A., Castro-Escarpullí G. // *Traffic*. 2017. V. 18. № 7. P. 425–432.
10. Turnbull L., Toyofuku M., Hynen A.L., Kurosawa M., Pessi G., Petty N.K., Osvath S.R., Cárcamo-Oyarce G., Gloag E.S., Shimoni R., Omasits U., Ito S., Yap X., Monahan L.G., Cavaliere R., Ahrens C.H., Charles I.G., Nomura N., Eberl L., Whitchurch C.B. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 11220.
11. Jan A.T. // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8: 1053.
12. Cecil J.D., Sirisaengtaksin N., O'Brien-Simpson N.M., Krachler A.M. // *Microbiol. Spectr.* 2019. V. 7. № 1.
13. Domingues S., Nielsen K.M. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2017. V. 38. P. 16–21.
14. Hatano T., Palani S., Papatziomou D., Salzer R., Souza D.P., Tamarit D., Makwana M., Potter A., Haig A., Xu W., Townsend D., Rochester D., Bellini D., Hussain H.M.A., Ettema T.J.G., Löwe J., Baum B., Robinson N.P., Balasubramanian M. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 3398.

15. Liu J., Tassinari M., Souza D.P., Naskar S., Noel J.K., Bohuszewicz O., Buck M., Williams T.A., Baum B., Low H.H. // *Cell*. 2021. V. 184. № 14. P. 3660–3673.
16. Schwachheimer C., Kuehn M.J. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. V. 13. № 10. P. 605–619.
17. Pisitkun T., Shen R.F., Knepper M.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 36. P. 13368–13373.
18. Kalra H., Simpson R.J., Ji H., Aikawa E., Altevogt P., Askenase P., Bond V.C., Borràs F.E., Breakefield X., Budnik V., Buzas E., Camussi G., Clayton A., Cocucci E., Falcon-Perez J.M., Gabrielsson S., Gho Y.S., Gupta D., Harsha H.C., Hendrix A., Hill A.F., Inal J.M., Jenster G., Krämer-Albers E.M., Lim S.K., Llorente A., Lötvall J., Marcilla A., Mincheva-Nilsson L., Nazarenko I., Nieuwland R., Nolte-’t Hoen E.N., Pandey A., Patel T., Piper M.G., Pluchino S., Prasad T.S., Rajendran L., Raposo G., Record M., Reid G.E., Sánchez-Madrid F., Schiffelers R.M., Siljander P., Stensballe A., Stoorvogel W., Taylor D., Thery C., Valadi H., van Balkom B.W., Vázquez J., Vidal M., Wauben M.H., Yáñez-Mó M., Zoeller M., Mathivanan S. // *PLoS Biol.* 2012. V. 10. № 12. e1001450.
19. Kim D.K., Kang B., Kim O.Y., Choi D.S., Lee J., Kim S.R., Go G., Yoon Y.J., Kim J.H., Jang S.C., Park K.S., Choi E.J., Kim K.P., Desiderio D.M., Kim Y.K., Lötvall J., Hwang D., Gho Y.S. // *J. Extracell. Vesicles*. 2013. V. 2. № 1.
20. Gurung S., Perocheau D., Touramanidou L., Baruteau J. // *Cell Commun. Signal*. 2021. V. 19. № 1. P. 47.
21. Raposo G., Stoorvogel W. // *J. Cell. Biol.* 2013. V. 200. № 4. P. 373–383.
22. Möbius W., Ohno-Iwashita Y., van Donselaar E.G., Oorschot V.M.J., Shimada Y., Fujimoto T., Heijnen H.F.G., Geuze H.J., Slot J.W. // *J. Histochem. Cytochem.* 2002. V. 50. № 1. P. 43–55.
23. Babst M., Katzmann D.J., Estepa-Sabal E.J., Meerloo T., Emr S.D. // *Dev. Cell*. 2002. V. 3. № 2. P. 271–282.
24. Wollert T., Hurley J.H. // *Nature*. 2010. V. 464. № 7290. P. 864–869.
25. Teis D., Saksena S., Emr S.D. // *Dev. Cell*. 2008. V. 15. № 4. P. 578–589.
26. Borges F.T., Melo S.A., Özdemir B.C., Kato N., Revuelta I., Miller C.A., Gattone V.H., LeBleu V.S., Kalluri R. // *J. Am. Soc. Nephrol.* 2013. V. 24. № 3. P. 385–392.
27. Mathieu M., Martin-Jaular L., Lavieu G., Théry C. // *Nat. Cell. Biol.* 2019. V. 21. № 1. P. 9–17.
28. Buzás E.I., Tóth E., Sódar B.W., Szabó-Taylor K. // *Semin. Immunopathol.* 2018. V. 40. № 5. P. 453–464.
29. Tóth E., Turiák L., Visnovitz T., Cserép C., Mázló A., Sódar B.W., Försonits A.I., Petővári G., Sebestyén A., Komlósi Z., Drahos L., Kittel A., Nagy G., Bácsi A., Dénes Á., Gho Y.S., Szabó-Taylor K.E., Buzás E.I. // *J. Extracell. Vesicles*. 2021. V. 10. № 11. e12140.
30. Яковлев А.А., Дружкова Т.А., Николаев Р.В., Кузнецова В.Е., Груздев С.К., Гехт А.Б., Гуляева Н.В. // *Нейрохимия*. 2019. V. 36. № 4. P. 346–352.
31. Ардаширова Н.С., Федотова Е.Ю., Иллариошкин С.Н. // *Нейрохимия*. 2020. V. 37. № 2. P. 99–105.
32. Иванова М.В., Чеканова Е.О., Белугин Б.В., Тутыгина И.Л., Должикова И.В., Закройщикова И.В., Васильев А.В., Захарова М.Н. // *Нейрохимия*. 2019. V. 36. № 3. P. 195–207.
33. Wang Y., Amdanee N., Zhang X. // *Eur. Psychiatry*. 2022. V. 65. № 1. e61.
34. Rajendran L., Honsho M., Zahn T.R., Keller P., Geiger K.D., Verkade P., Simons K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 30. P. 11172–11177.
35. Gruzdev S.K., Yakovlev A.A., Druzhkova T.A., Guekht A.B., Gulyaeva N.V. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2019. V. 39. № 6. P. 729–750.
36. Khaspekov L.G., Yakovlev A.A. // *Neurochem. J.* 2023. V. 39. № 1. P. 1–18.
37. van Niel G., D’Angelo G., Raposo G. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2018. V. 19. № 4. P. 213–228.
38. Hurley J.H. // *EMBO J.* 2015. V. 34. № 19. P. 2398–2407.
39. Sadoul R., Laporte M.H., Chassefeyre R., Chi K., Goldberg Y., Chatellard C., Hemming F.J., Fraboulet S. // *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2018. V. 74. P. 40–49.
40. Bissig C., Gruenberg J. // *Trends Cell Biol.* 2014. V. 24. № 1. P. 19–25.
41. Colombo M., Moita C., van Niel G., Kowal J., Vigneron J., Benaroch P., Manel N., Moita L.F., Théry C., Raposo G. // *J. Cell. Sci.* 2013. V. 126. № 24. P. 5553–5565.
42. Smith V.L., Jackson L., Schorey J.S. // *J. Immunol.* 2015. V. 195. № 6. P. 2722–2730.
43. Villarroya-Beltri C., Baixauli F., Mittelbrunn M., Fernández-Delgado I., Torralba D., Moreno-Gonzalo O., Baldanza S., Enrich C., Guerra S., Sánchez-Madrid F. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 13588.
44. Nabhan J.F., Hu R., Oh R.S., Cohen S.N., Lu Q. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 11. P. 4146–4151.
45. Mageswaran S.K., Dixon M.G., Curtiss M., Keener J.P., Babst M. // *Traffic*. 2014. V. 15. № 2. P. 212–229.
46. Shields S.B., Oestreich A.J., Winistorfer S., Nguyen D., Payne J.A., Katzmann D.J., Piper R. // *J. Cell. Biol.* 2009. V. 185. № 2. P. 213–224.
47. Reggiori F., Pelham H.R.B. // *EMBO J.* 2001. V. 20. № 18. P. 5176–5186.
48. Yamashita Y., Kojima K., Tsukahara T., Agawa H., Yamada K., Amano Y., Kurotori N., Tanaka N., Sugamura K., Takeshita T. // *J. Cell. Sci.* 2008. V. 121. № 10. P. 1727–1738.
49. Ferreira J.V., da Rosa Soares A., Ramalho J., Carvalho C.M., Cardoso M.H., Pintado P., Carvalho A.S., Beck H.C., Matthiesen R., Zuzarte M., Girão H., van Niel G., Pereira P. // *Sci. Adv.* 2022. V. 8. № 12. eabm1140.
50. Ferreira J.V., da Rosa Soares A., Pereira P. // *Autophagy*. 2022. V. 18. № 9. P. 2263–2265.
51. Trajkovic K., Hsu C., Chiantia S., Rajendran L., Wenzel D., Wieland F., Schwille P., Brügger B., Simons M. // *Science*. 2008. V. 319. № 5867. P. 1244–1247.
52. Shamseddine A.A., Airola M., Hannun Y.A. // *Adv. Biol. Regul.* 2015. V. 57. P. 24–41.
53. Menck K., Sönmezer C., Worst T.S., Schulz M., Dihazi G.H., Streit F., Erdmann G., Kling S., Boutros M., Binder C., Gross J.C. // *J. Extracell. Vesicles*. 2017. V. 6. № 1. P. 1378056.
54. Stoffel W., Hammels I., Jenke B., Binczek E., Schmidt-soltan I., Brodesser S., Schauss A., Etich J., Heilig J., Zaucke F. // *Cell Death Dis.* 2016. V. 7. № 11. P. e2488.
55. Scarlatti F., Bauvy C., Ventruti A., Sala G., Cluzaud F., Vandewalle A., Ghidoni R., Codogno P. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 18. P. 18384–18391.
56. Beer K.B., Rivas-Castillo J., Kuhn K., Fazeli G., Karman B., Nance J.F., Stigloher C., Wehman A.M. //

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. № 6. P. E1127–E1136.
57. Fujii T., Sakata A., Nishimura S., Eto K., Nagata S. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. № 41. P. 12800–12805.
 58. Baietti M.F., Zhang Z., Mortier E., Melchior A., Degeest G., Geeraerts A., Ivarsson Y., Depoortere F., Coomans C., Vermeiren E., Zimmermann P., David G. // Nat. Cell Biol. 2012. V. 14. № 7. P. 677–685.
 59. Imjeti N.S., Menck K., Egea-Jimenez A.L., Lecointre C., Lembo F., Bouguenina H., Badache A., Ghossoub R., David G., Roche S., Zimmermann P. // Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2017. V. 114. № 47. P. 12495–12500.
 60. Ghossoub R., Lembo F., Rubio A., Gaillard C.B., Bouchet J., Vitale N., Slavik J., Machala M., Zimmermann P. // Nat. Commun. 2014. V. 5. P. 2477.
 61. Durcin M., Fleury A., Taillebois E., Hilairret G., Krupova Z., Henry C., Truchet S., Trötz Müller M., Köfeler H., Mabileau G., Hue O., Andriantsitohaina R., Martin P., Le Lay S. // J. Extracell. Vesicles. 2017. V. 6. № 1. P. 1305677.
 62. Muralidharan-Chari V., Clancy J., Plou C., Romao M., Chavrier P., Raposo G., D'Souza-Schorey C. // Curr. Biol. 2009. V. 19. № 22. P. 1875–1885.
 63. Scott C.C., Gruenberg J. // Bioessays. 2011. V. 33. № 2. P. 103–110.
 64. Forgas M. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007. V. 8. № 11. P. 917–929.
 65. Gowrisankaran S., Milosevic I. // IUBMB Life. 2020. V. 72. № 4. P. 568–576.
 66. Wang D., Hiesinger P.R. // J. Cell Biol. 2013. V. 203. № 2. P. 171–173.
 67. Guo H., Chitiprolu M., Roncevic L., Javalet C., Hemming F.J., Trung M.T., Meng L., Latreille E., Tanese de Souza C., McCulloch D., Baldwin R.M., Auer R., Côté J., Russell R.C., Sadoul R., Gibbings D. // Dev. Cell. 2017. V. 43. № 6. P. 716–730.
 68. Latifkar A., Ling L., Hingorani A., Johansen E., Clement A., Zhang X., Hartman J., Fischbach C., Lin H., Cerione R.A., Antonyak M.A. // Dev. Cell. 2019. V. 49. № 3. P. 393–408.
 69. Wang L., Wu D., Robinson C. V., Wu H., Fu T.M. // Mol. Cell. 2020. V. 80. № 3. P. 501–511.
 70. Choezom D., Gross J.C. // J. Cell Sci. 2022. V. 35. № 5. jcs259324.
 71. Shelke G.V., Yin Y., Jang S.C., Lässer C., Wennmalm S., Hoffmann H.J., Li L., Gho Y.S., Nilsson J.A., Lötvall J. // J. Extracell. Vesicles. 2019. V. 8. № 1. P. 1650458.
 72. Poëa-Guyon S., Ammar M.R., Erard M., Amar M., Moreau A.W., Fossier P., Gleize V., Vitale N., Morel N. // J. Cell Biol. 2013. V. 203. № 2. P. 283–298.
 73. Stenmark H. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009. V. 10. № 8. P. 513–525.
 74. Rink J., Ghigo E., Kalaidzidis Y., Zerial M. // Cell. 2005. V. 122. № 5. P. 735–749.
 75. Wei D., Zhan W., Gao Y., Huang L., Gong R., Wang W., Zhang R., Wu Y., Gao S., Kang T. // Cell Res. 2021. V. 31. № 2. P. 157–177.
 76. Verweij F.J., Bebelman M.P., George A.E., Couty M., Bécot A., Palmulli R., Heiligenstein X., Sirés-Campos J., Raposo G., Pegtel D.M., van Niel G. // J. Cell Biol. 2022. V. 221. № 12. e202112032.
 77. 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., Hacohen N., Fukuda M., Desnos C., Seabra M.C., Darchen F., Amigorena S., Moita L.F., Thery C. // Nat. Cell Biol. 2010. V. 12. № 1. P. 19–30.
 78. Hsu C., Morohashi Y., Yoshimura S.I., Manrique-Hoyos N., Jung S.Y., Lauterbach M.A., Bakhti M., Grønborg M., Möbius W., Rhee J.S., Barr F.A., Simons M. // J. Cell Biol. 2010. V. 189. № 2. P. 223–232.
 79. Savina A., Fader C.M., Damiani M.T., Colombo M.I. // Traffic. 2005. V. 6. № 2. P. 131–143.
 80. Khvotchev M.V., Ren M., Takamori S., Jahn R., Südhof T.C. // J. Neurosci. 2003. V. 23. № 33. P. 10531–10539.
 81. Laporte M.H., Chi K. il, Caudal L.C., Zhao N., Schwarz Y., Rolland M., Martínez-Hernández J., Martineau M., Chatellard C., Denariet E., Mercier V., Lemaître F., Blot B., Moutaux E., Cazorla M., Perrais D., Lanté F., Bruns D., Fraboulet S., Hemming F.J., Kirchhoff F., Sadoul R. // PLoS Biol. 2022. V. 20. № 6. e3001659.
 82. Sheehan P., Zhu M., Beskow A., Vollmer C., Waites C.L. // J. Neurosci. 2016. V. 36. № 33. P. 8668–8686.
 83. Hemming F.J., Fraboulet S., Blot B., Sadoul R. // Neuroscience. 2004. V. 123. № 4. P. 887–895.
 84. Giorgini F., Steinert J.R. // Commun. Integr. Biol. 2013. V. 6. № 6. e26807.
 85. Ascaño M., Richmond A., Borden P., Kuruvilla R. // J. Neurosci. 2009. V. 29. № 37. P. 11674–11685.
 86. Park M. // Front. Cell. Neurosci. 2018. V. 12: 361.
 87. Sultana P., Novotny J. // ASN Neuro. 2022. V. 14. 175909142211423.
 88. Gross J.C., Chaudhary V., Bartscherer K., Boutros M. // Nat. Cell Biol. 2012. V. 14. № 10. P. 1036–1045.
 89. Hyenne V., Apaydin A., Rodriguez D., Spiegelhalter C., Hoff-Yoessle S., Diem M., Tak S., Lefebvre O., Schwab Y., Goetz J.G., Labouesse M. // J. Cell Biol. 2015. V. 211. № 1. P. 27–37.
 90. Koles K., Nunnari J., Korkut C., Barria R., Brewer C., Li Y., Leszyk J., Zhang B., Budnik V. // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. № 20. P. 16820–16834.
 91. Verweij F.J., Bebelman M.P., Jimenez C.R., Garcia-Vallejo J.J., Janssen H., Neeffjes J., Knol J.C., de Goeijde Haas R., Piersma S.R., Baglio S.R., Verhage M., Middeldorp J.M., Zomer A., van Rheezen J., Coppelino M.G., Hurbain I., Raposo G., Smit M.J., Toonen R.F.G., van Niel G., Pegtel D.M. // J. Cell Biol. 2018. V. 217. № 3. P. 1129–1142.
 92. Sedgwick A.E., D'Souza-Schorey C. // Traffic. 2018. V. 19. № 5. P. 319–327.
 93. Granger E., McNeer G., Allan V., Woodman P. // Semin. Cell Dev. Biol. 2014. V. 31. № 100. P. 20–29.
 94. Jackson C.E., Scruggs B.S., Schaffer J.E., Hanson P.I. // Biophys. J. 2017. V. 113. № 6. P. 1342–1352.
 95. Mulcahy L.A., Pink R.C., Carter D.R.F. // J. Extracell. Vesicles. 2014. V. 3. P. 24641.
 96. Tkach M., Kowal J., Zucchetti A.E., Enserink L., Jouve M., Lankar D., Saitakis M., Martin-Jaular L., Théry C. // EMBO J. 2017. V. 36. № 20. P. 3012–3028.
 97. Luga V., Zhang L., Vilorio-Petit A.M., Ogunjimi A.A., Inanlou M.R., Chiu E., Buchanan M., Hosein A.N., Basik M., Wrana J.L. // Cell. 2012. V. 151. № 7. P. 1542–1556.
 98. Skog J., Würdinger T., van Rijn S., Meijer D.H., Gainche L., Curry W.T., Carter B.S., Krichevsky A.M., Breakefield X.O. // Nat. Cell Biol. 2008. V. 10. № 12. P. 1470–1476.

99. Al-Nedawi K., Meehan B., Micallef J., Lhotak V., May L., Guha A., Rak J. // *Nat. Cell Biol.* 2008. V. 10. № 5. P. 619–624.
100. Korkut C., Li Y., Koles K., Brewer C., Ashley J., Yoshihara M., Budnik V. // *Neuron.* 2013. V. 77. № 6. P. 1039–1046.
101. Vilcaes A.A., Chanaday N.L., Kavalali E.T. // *Neuron.* 2021. V. 109. № 6. P. 971–983.
102. Chivet M., Javelet C., Laulagnier K., Blot B., Hemming F.J., Sadoul R. // *J. Extracell. Vesicles.* 2014. V. 3. P. 24722.
103. Mack M., Kleinschmidt A., Brühl H., Klier C., Nelson P.J., Cihak J., Plachý J., Stangassinger M., Erfle V., Schlöndorff D. // *Nat. Med.* 2000. V. 6. № 7. P. 769–775.
104. Fitzner D., Schnaars M., van Rossum D., Krishnamoorthy G., Dibaj P., Bakhti M., Regen T., Hanisch U.K., Simons M. // *J. Cell Sci.* 2011. V. 124. № 3. P. 447–458.
105. Frühbeis C., Fröhlich D., Kuo W.P., Krämer-Albers E.M. // *Front. Cell. Neurosci.* 2013. V. 7. P. 182.
106. Costa Verdera H., Gitz-Francois J.J., Schiffelers R.M., Vader P. // *J. Control. Release.* 2017. V. 266. P. 100–108.
107. Horibe S., Tanahashi T., Kawachi S., Murakami Y., Rikitake Y. // *BMC Cancer.* 2018. V. 18. № 1. P. 47.
108. Kamerkar S., Lebleu V.S., Sugimoto H., Yang S., Ruiivo C.F., Melo S.A., Lee J.J., Kalluri R. // *Nature.* 2017. V. 546. № 7659. P. 498–503.
109. Christianson H.C., Svensson K.J., van Kuppevelt T.H., Li J.P., Belting M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 43. P. 17380–17385.
110. Miyanishi M., Tada K., Koike M., Uchiyama Y., Kitamura T., Nagata S. // *Nature.* 2007. V. 450. № 7168. P. 435–439.
111. Schneider W.J., Beisiegel U., Goldstein J.L., Brown M.S. // *J. Biol. Chem.* 1982. V. 257. № 5. P. 2664–2673.
112. Kanada M., Bachmann M.H., Hardy J.W., Frimannson D.O., Bronsart L., Wang A., Sylvester M.D., Schmidt T.L., Kaspar R.L., Butte M.J., Martin A.C., Contag C.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 12. P. E1433–E1442.
113. Parolini I., Federici C., Raggi C., Lugini L., Palleschi S., de Milito A., Coscia C., Iessi E., Logozzi M., Molinari A., Colone M., Tatti M., Sargiacomo M., Fais S. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 49. P. 34211–34222.
114. Santos M.F., Rappa G., Karbanová J., Kurth T., Corbeil D., Lorico A. // *J. Biol. Chem.* 2018. V. 293. № 36. P. 13834–13848.
115. Heusermann W., Hean J., Trojer D., Steib E., von Bueren S., Graff-Meyer A., Genoud C., Martin K., Pizzato N., Voshol J., Morrissey D.V., Andaloussi S.E., Wood M.J., Meisner-Kober N.C. // *J. Cell Biol.* 2016. V. 213. № 2. P. 173–184.
116. Kowal J., Arras G., Colombo M., Jouve M., Morath J.P., Prindal-Bengtson B., Dingli F., Loew D., Tkach M., Théry C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 8. P. E968–E977.
117. Reátegui E., van der Vos K.E., Lai C.P., Zeinali M., Atai N.A., Aldikacti B., Floyd F.P., Khankhel A., Thapar V., Hochberg F.H., Sequist L.V., Nahed B.V., Carter B.S., Toner M., Balaj L., Ting D.T., Breakefield X.O., Stott S.L. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 175.
118. Xu R., Greening D.W., Chen M., Rai A., Ji H., Takahashi N., Simpson R.J. // *Proteomics.* 2019. V. 19. № 8. P. e1700453.
119. Castillo J., Bernard V., San Lucas F.A., Allenson K., Capello M., Kim D.U., Gascoyne P., Mulu F.C., Stephens B.M., Huang J., Wang H., Momin A.A., Jacamo R.O., Katz M., Wolff R., Javle M., Varadhachary G., Wistuba I.I., Hanash S., Maitra A., Alvarez H. // *Ann. Oncol.* 2018. V. 29. № 1. P. 223–229.
120. Belov L., Matic K.J., Hallal S., Best O.G., Mulligan S.P., Christopherson R.I. // *J. Extracell. Vesicles.* 2016. V. 5. P. 25355.
121. Mustapic M., Eitan E., Werner J.K., Berkowitz S.T., Lazaropoulos M.P., Tran J., Goetzl E.J., Kapogiannis D. // *Front. Neurosci.* 2017. V. 11. P. 278.
122. Noguera-Ortiz C.J., Mahairaki V., Delgado-Peraza F., Das D., Avgerinos K., Eren E., Hentschel M., Goetzl E.J., Mattson M.P., Kapogiannis D. // *Cells.* 2020. V. 9. № 7. P. 1618.
123. Goetzl E.J., Boxer A., Schwartz J.B., Abner E.L., Petersen R.C., Miller B.L., Kapogiannis D. // *Neurology.* 2015. V. 85. № 1. P. 40–47.
124. Cvjetkovic A., Jang S.C., Konečná B., Höög J.L., Sihlbom C., Lässer C., Lötvall J. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 36338.
125. Bandu R., Oh J.W., Kim K.P. // *Exp. Mol. Med.* 2019. V. 51. № 3. P. 1–10.

Structural Determinants of Small Extracellular Vesicles (Exosomes) and Their Role in Biological Functions

A. M. Turchinets^a and A. A. Yakovlev^{a, b}

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

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

Extracellular vesicles (EVs) are a new and actively developing area of modern experimental and theoretical biology, which attracts researchers primarily by the possibility of using EVs as diagnostic biomarkers and therapeutic agents. Currently, the greatest amount of data has been accumulated on small extracellular vesicles (sEVs) – exosomes, vesicles of endosomal origin, and ectosomes (previously known as microvesicles), which are the product of direct budding from the plasma membrane. In this review, we address the major steps in the biogenesis of exosomes and ectosomes, the major processes of intracellular membrane trafficking, and signaling involving sEVs. The role of the sEVs in the physiology and pathophysiology of the nervous system is also discussed, as well as many promising aspects of the study of sEVs biology.

Keywords: extracellular vesicles, small extracellular vesicles, exosomes, ESCRT, SNARE, Rab-GTPase, signaling, endolysosomal system, multivesicular body, membrane trafficking, intercellular communications

УДК 576.54,615.038,616.8-085.2/.3

STATE-OF-THE-ART: ПРИМЕНЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ И ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ ДЛЯ НЕЙРОПРОТЕКЦИИ И СТИМУЛЯЦИИ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНИ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ

© 2023 г. Н. А. Басалова^{1, 2}, С. С. Джауари², Ю. А. Юршев², А. Л. Примак²,
А. Ю. Ефименко^{1, 2, *}, В. А. Ткачук^{1, 2}, М. Н. Карагяур^{1, 2, *}

¹Институт регенеративной медицины, Медицинский научно-образовательный центр,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

²Факультет фундаментальной медицины, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Поступила в редакцию 02.06.2023 г.

После доработки 03.06.2023 г.

Принята к публикации 04.06.2023 г.

Внеклеточные везикулы представляют собой макромолекулярные комплексы, продуцируемые практически всеми типами эукариотических и прокариотических клеток. Согласно современным представлениям, они позволяют клеткам обмениваться информацией, регулировать активность друг друга и координировать свои действия в процессах развития организма, поддержания гомеостаза, регенерации тканей и пр. Внеклеточные везикулы обладают рядом уникальных свойств: способностью накапливать определенные типы белков и нуклеиновых кислот, защищать их от дегградации и обеспечивать их доставку в целевые клетки, что может быть использовано при создании биомиметических подходов к терапии широкого спектра заболеваний. Состав везикул, предпочтение к докингу с определенным типом клеток и, в конечном счете, их терапевтический потенциал являются очень гибкими параметрами и в высокой степени зависят от типа и свойств культуры клеток-продуцентов, а также условий культивирования. Данный обзор дает представление о состоянии и перспективности терапевтических стратегий, предполагающих использование внеклеточных везикул для нейропротекции и стимуляции регенерации ткани головного мозга после повреждения, а также рассматривает существующие клинические исследования с применением внеклеточных везикул в области неврологии и нейрохирургии. Особое внимание в обзоре уделено новым перспективным подходам к увеличению продукции внеклеточных везикул, манипуляции их содержанием и увеличению эффективности направленного докинга с целью увеличения их терапевтической активности и специфичности.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, ESCRT, нейропротекция, нейровоспаление, мезенхимные стромальные клетки, нейральные стволовые клетки

DOI: 10.31857/S1027813323040076, EDN: SXVPPH

ВВЕДЕНИЕ

Увеличение средней продолжительности жизни коррелирует с ростом частоты встречаемости сосудистых патологий головного мозга: острых и хронических нарушений мозгового кровообращения [1]. Ряд данных заболеваний (геморрагический инсульт) и их отсроченных последствий (демиелинизирующие и нейродегенеративные состояния) на сегодняшний день не имеют эффективной патогенетической терапии и являются нерешенной медицинской проблемой [2, 3].

В то же время, исследования последних лет показывают, что создание препаратов, способных замедлить прогрессирование повреждения мозговой ткани и стимулировать ее регенерацию, принципиально возможно [4–6]. В частности, основной для их создания могут стать нейральные стволовые клетки (НСК) и мезенхимные стволовые/стромальные клетки (МСК) или продукты их секреции, содержащие широкий спектр биологически активных веществ и молекулярных комплексов, переносимых в виде растворимых факторов и в составе внеклеточных везикул (ВВ) [4–6]. Множество исследований, как *in vitro*, так и *in vivo*, демонстрируют, что компоненты секрета обладают нейропротективными и противовос-

* Адресат для корреспонденции: 119192, Россия, Москва, Ломоносовский проспект, 27/10, e-mail: efimenkoay@my.msu.ru, m.karagyaour@mail.ru.

палительными свойствами, т.е. способны препятствовать развитию патогенетических механизмов, характерных для острейшего и острого периодов в клинике повреждений мозговой ткани [7, 8]. Помимо этого, компоненты секретама способны стимулировать восстановление на подострой и хронической стадиях поврежденной мозговой ткани, запуская процессы ангиогенеза, нейрогенеза и активируя резидентные стволовые клетки [9, 10].

Растворимые факторы и молекулярные комплексы (прежде всего, везикулы), входящие в состав секретама стволовых клеток, обладают различными механизмами действия и динамикой реализации биологического эффекта, и вследствие этого функционально дополняют друг друга. Так, нейротрофические факторы роста и цитокины в составе секретама в основном обеспечивают немедленный эффект секретама (нейропротекция в острейшем и остром периоде) через активацию специфических рецепторов и сигнальных каскадов [11, 12], однако, продолжительность такого эффекта невелика ввиду быстрой деградации этих белковых молекул в очаге повреждения. Большинство белков, входящих в состав растворимой фракции секретама, не способно проникать через гематоэнцефалический барьер [13].

Компоненты везикулярной фракции секретама (экзосомы, микровезикулы и пр.) обладают принципиально другим механизмом реализации биологической активности: прежде всего, они переносят кодирующие и не кодирующие регуляторные РНК, которые, проникая внутрь целевых клеток, способны изменять транскрипционную активность последних [14, 15]. Это позволяет управлять поведением клеток и/или изменять их свойства на достаточно длительный период времени, что необходимо для полноценной регенерации поврежденной ткани. Везикулы обладают и другим важным для реализации нейропротективной активности свойством – способностью проникать через гематоэнцефалический барьер [16, 17], что потенциально позволяет им достигать поврежденных клеток в очаге повреждения, даже при внутривенном введении. Совокупность свойств ВВ позволяет рассматривать их, как основу для разработки перспективных лекарственных кандидатов для нейропротекции и профилактики осложнений после повреждения нервной ткани.

Более того, активное развитие молекулярно-биологических и клеточных технологий позволяет многократно усилить потенциал технологии ВВ. Так, на сегодняшний день реальностью стали как подходы, увеличивающие эффективность загрузки ВВ необходимыми молекулами и повышающие специфичность их докинга с целевыми клетками, так и подходы к направленному изменению условий культивирования клеток, усили-

вающие продукцию ВВ [18, 19]. Высокий терапевтический потенциал препаратов на основе ВВ, а также взрывной рост достижений в этой области подтолкнул нас к написанию данного обзора, в котором мы хотим рассмотреть накопленный опыт, перспективы и ограничения применения таких препаратов в терапии повреждений мозговой ткани.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ: ПОДТИПЫ И МЕХАНИЗМЫ БИОГЕНЕЗА

Механизм передачи информации посредством продукции и захвата ВВ является консервативным и встречается у всех живых организмов от прокариот до высших эукариот [20]. Изначально секреция ВВ рассматривалась лишь как способ утилизации ненужных клетке компонентов, однако сейчас их считают важнейшим способом коммуникации между клетками. На сегодняшний день известно, что ВВ переносят от клетки к клетке в неизменном состоянии рецепторы, факторы роста, липидные комплексы, нуклеиновые кислоты (включая различные типы РНК), делая возможной одновременную передачу нескольких различных типов сигнальных молекул в нативном виде [20–22].

Морфологически ВВ представляют собой покрытые билипидной мембраной полые пузырьки [23, 24]. Их классификация в настоящее время базируется на биогенезе, размере и биологических функциях (табл. 1). Основываясь на этих параметрах, выделяют множество типов ВВ [20, 25]. Однако в терапевтическом применении важными уже долгое время остаются следующие два основных класса: экзосомы и микровезикулы [25, 26].

В отличие от микровезикул, которые имеют размеры 100–1000 нм и “отпочковываются” непосредственно от плазматической мембраны, экзосомы имеют существенно меньший размер (около 50–150 нм) и синтезируются в эндолизосомальном компартменте, также называемом компартментом мультивезикулярных телец (multivesicular endosomes, MVBs) [27]. Биогенез экзосом принято сейчас разделять на несколько параллельных независимых путей, в частности, ESCRT (endosomal sorting complex required for transport)-зависимый механизм и ESCRT-независимый путь, задействующий тетраспанины [20, 28].

ВВ разных типов не имеют уникальных специфических маркеров, поскольку все маркеры, предложенные на данный момент для идентификации, могут быть в той или иной степени экспонированы как на экзосомах, так и на микровезикулах. Выделение и очистка ВВ может быть выполнена различными методами, включая такие как ультрацентрифугирование, ультрафильтрация, цен-

Таблица 1. Характеристика основных типов ВВ [22, 25]

Тип везикул	Характеристики			
	происхождение	размер, нм	маркеры	содержимое
Экзосомы	Эндолизосомальный путь; интралюминальное отпочковывание в мультивезикулярном компартменте и слияние частиц с плазматической мембраной	50–150	Тетраспанины (напр. TSPAN29 и TSPAN30), ESCRT, PDCD6IP, TSG101, флотилин	мРНК, миРНК цитоплазматические и мембранные белки, включая рецепторы и МНС молекулы
Микровезикулы	Клеточная мембрана, отпочковывание напрямую от плазматической мембраны	100–1000	Интегрины, селектины, CD40 лиганд	мРНК, миРНК цитоплазматические и мембранные белки, включая рецепторы
Апоптотические везикулы и тельца	Клеточная мембрана; в процессе пузырения клеток, вступивших в апоптоз	100–5000	Значительное количество фосфатидилсерина	Любые фрагменты клеток, включая фрагменты клеточных органелл

трифугирование в градиенте сахарозы, иммунопреципитация, высокоэффективная жидкостная хроматография и другие [29]. Разнообразие методов выделения ВВ, отсутствие специфических маркеров и стандартных протоколов по выделению, приводит к получению “смешанных” фракций и появлению проблемы правильной интерпретации результатов. Поскольку на сегодняшний день не представляется возможным 100% четкое разделение фракции ВВ на экзосомы и мультивезикулярные тельца, во многих статьях термин “внеклеточные везикулы” используется для обозначения обоих типов.

МЕХАНИЗМЫ СОРТИРОВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ВО ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ

Содержимое ВВ варьирует в зависимости от их типа, свойств и условий культивирования клеток-продуцентов [30]. Необходимым условием создания препаратов на основе ВВ является разработка подходов к получению терапевтически значимых количеств ВВ с относительно постоянным составом по ключевым активным (действующим) молекулам. Большая часть содержимого ВВ оказывается в них посредством отщуривания участка цитоплазмы и, соответственно, может включать практически любой из компонентов цитоплазмы [31]. Таким образом, во ВВ попадают цитоплазматические белки, мРНК и некодирующие РНК, однако существует ряд природных механизмов, которые обогащают содержимое ВВ (прежде всего, это касается экзосом) определенными типами белков и РНК. Изучение данных механизмов, поиск подходов к манипуляции ими и разработка новых биомиметических подходов с

высокой вероятностью позволят приблизить создание целого ряда препаратов для коррекции острых и хронических патологий нервной системы.

Как и следует из названия при ESCRT-опосредованном механизме образования экзосом ключевую роль в направленной сортировке белков в везикулы выполняют компоненты системы ESCRT (ESCRT-0/-I/-II/-III), которые, идентифицируя меченные белки, стягивают их в формирующиеся экзосомы [32, 33]. Существует множество указаний на то, что основным способом мечения сортируемых белков являются их пост-трансляционные модификации (ПТМ), при этом большое количество белков-участников системы ESCRT (порядка 20) и их уникальные свойства позволяют системе ESCRT распознавать широкий спектр ПТМ [34]. Так, компоненты ESCRT-0/-I/-II распознают белки, убиквитинилированные по остатку Lys-63 [35]. Данный тип убиквитинилирования осуществляют убиквитинлигазы семейства Nedd4, распознающие сигнальную пептидную последовательность PPxY [36]. SUMOилирование белков, т.е. их конъюгация с белком SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) посредством SUMO-конъюгирующих ферментов (например, UBC9), также является одним из способов мечения белков, подлежащих сортировке в экзосомы [37]. Предполагают, что ключевую роль в сортировке SUMOилированных белков в формирующиеся ВВ выполняют компоненты ESCRT-III [38]. Одним из белков, который транспортируется в экзосомы по данному механизму является гетерогенный ядерный нуклеопротеин hnRNP2B1, который считается ключевым участником направленного транспорта микроРНК и днРНК (длинных некодирующих РНК) во ВВ [39].

Сигналом к сортировке белков в экзосомы могут служить и другие виды ПТМ: фосфорилирование (с участием сериновых, тирозиновых и треониновых киназ) [40], N-гликозилирование остатками маннозы и полилактозы (осуществляется ферментами семейства N-ацетилглюкозаминилтрансфераз) [41] и, по-видимому, цитруллинирование остатков аргинина (осуществляет фермент пептидил-аргинин-дезаминаза) [42].

Строгого доказательства роли цитруллинирования белков в мечении их для системы ESCRT нет, однако в пользу этого косвенно свидетельствует высокое содержание таких белков во ВВ (фибронектин, α 2-микроглобулин, фибриноген, отдельные цепи иммуноглобулинов) [43]. Стоит отметить, что ни один из видов ПТМ белков, подлежащих сортировке во ВВ, не является универсальным — эффект такой модификации во многом определяется ее характером (например, убиквитинилирование по остаткам Lys-46 или -63), свойствами белка-мишени, типом клеток и соотношением в ней отдельных компонентов системы ESCRT [40–44]. Система сортировки содержимого ВВ является тонко настроенным механизмом и многое в ее функционировании и регуляции пока остается неясным.

В ряде случаев активная сортировка белков во ВВ может играть и негативную роль, опосредуя загрузку во ВВ патогенных молекул, что приводит к диссеминации патогена и способствует более быстрому прогрессированию заболевания. Так, было показано, что Nedd4-зависимое убиквитинилирование является необходимым условием сортировки вирусных белков (ретровирусов и вируса Эпштейн–Барра) во ВВ [45], SUMOилирование играет важную роль в везикул-опосредованной диссеминации α -Синуклеина и прогрессировании болезни Паркинсона [46], а фосфорилирование Тау-белка по остатку Thr-1801 способствует его упаковке в формирующиеся экзосомы и ускоряет течение болезни Альцгеймера [47].

Помимо ПТМ сортировка отдельных белков во ВВ может определяться наличием у них определенных белковых доменов: WW-домен и Coiled coil-домен [44]. Механизм сортировки таких белков, по-видимому, обусловлен их белок-белковыми взаимодействиями с ПТМ-мечеными белками с последующим транспортом образовавшихся комплексов в везикулы.

Существует и ESCRT-независимый путь формирования ВВ, в котором задействованы тетраспанины, сфинголипиды и церамиды, однако механизм его функционирования пока не полностью понятен. Показано, что тетраспанины способны формировать в мембране “островки” (участки повышенной со-локализации), вызывая искривление поверхности мембраны, а связанные с ними белки цитоскелета способствуют смыка-

нию краев и отпочковыванию экзосом [48]. Было показано, что важную роль в латеральном взаимодействии тетраспанинов играют их ПТМ: пальмитолеирование и миристилирование [48, 49]. Что касается загрузки ВВ, образующихся по ESCRT-независимому механизму, то она, по-видимому, обусловлена способностью тетраспанинов взаимодействовать с мембранными белками и белками цитоскелета с последующей их со-локализацией в экзосомы [48]. При этом было показано, что моно- и полиубиквитинилирование сортируемых белков увеличивает вероятность их упаковки в экзосомы. Каждый из тетраспанинов обладает сродством к определенному спектру белков, что и обеспечивает вариабельность состава таких экзосом в зависимости от типа клеток-продуцентов и их физиологического состояния.

Для сортировки кодирующих и регуляторных РНК в экзосомы было показано несколько механизмов, большинство из которых включает ко-транспорт с РНК-связывающим белком (белки семейства hnRNP, YBX1, белки аргонавты Ago2 и др.) [39, 44]. Так, белки hnRNPA1 и hnRNPA2B1 способны распознавать и связывать молекулы РНК, содержащие GAGAG/GGAG-последовательности, соответственно [50, 51]. В ряде работ было также установлено, что существуют и альтернативные механизмы транспорта микроРНК в экзосомы, обусловленные аденилированием или уридилированием (в зависимости от типа клеток-продуцентов) 3'-конца микроРНК, а также активностью нейтральной сфингомиелиназы 2 и продукцией церамида, однако детали функционирования этих механизмов изучены недостаточно [44].

ОПЫТ ПРИМЕНЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ И ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ЦНС

В нервной системе ВВ являются важными участниками межклеточной коммуникации и играют важную роль в поддержании и восстановлении нейронных функций [52, 53]. С бурным технологическим развитием ВВ стали использовать для расширения терапевтических возможностей, например, для адресной доставки лекарств [54, 55]. В контексте систем доставки клиническое одобрение получили и некоторые хорошо зарекомендовавшие себя синтетические наноструктуры, такие как липосомы [56]. Однако важно уточнить, что их терапевтические эффекты оказались ограничены из-за активации систем врожденного иммунитета и быстрого выведения из крови [57]. В сравнении с синтетическими системами доставки лекарств, ВВ представляют собой более сложную и биосовместимую форму доставки и менее иммуногенны, а различные поверхностные мембранные молекулы ВВ позволяют им преодо-

левать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и адресно доставлять свое содержимое к клеткам-мишеням [58–60]. Указанные свойства ВВ демонстрируют их огромный терапевтический потенциал при лечении заболеваний центральной нервной системы (ЦНС).

Патофизиологические механизмы, лежащие в основе неврологических заболеваний достаточно сложны и некоторые из них еще предстоит досконально изучить. Важной особенностью патологий головного мозга является то, что, в целом, для них характерны одни и те же патогенетические/патофизиологические звенья, а различия в клинической картине по большей части обусловлены преобладанием того или иного патологического процесса или процессов, областью и объемом повреждения. Так, для острых повреждений головного мозга (инсульты, травмы головного мозга, острые интоксикации и инфекционные болезни) ключевыми звеньями патогенеза являются ишемическое, глутамат-опосредованное и гемоглобин-опосредованное повреждение нейронов, нарушение гематоэнцефалического барьера и нейровоспаление, которые в совокупности приводят ко вторичному повреждению мозговой ткани и расширению первичного очага повреждения [61, 62]. При хроническом повреждении (нейродегенеративные и демиелинизирующие заболевания) в патогенезе преобладают играют нейровоспаление и ишемическое повреждение мозговой ткани [63]. Общность патогенетических механизмов, лежащих в основе острых и хронических повреждений головного мозга, позволяет предположить, что лекарственный кандидат, обладающий комплексным действием и препятствующий развитию таких патологических процессов, может оказаться действенным универсальным средством для лечения широкого спектра повреждений мозговой ткани и профилактики возможных осложнений.

Первоначально для стимуляции нейропротекции и стимуляции процессов регенерации в нервной ткани после повреждения были предложены методы клеточной терапии, в том числе, с использованием МСК [64, 65]. МСК благодаря своей паракринной активности регулируют иммунный ответ, индуцируют ангиогенез и обеспечивают трофическую поддержку поврежденных нейронов, обеспечивая восстановление и регенерацию нервной ткани, поэтому они были исследованы в качестве потенциальных терапевтических агентов для лечения широкого спектра неврологических нарушений [66].

Безопасность при внутривенном введении МСК была подтверждена в клинических испытаниях, но терапевтический эффект данного вида клеточной терапии в группах пациентов оказался ограничен [67, 68]. Так, например, после систем-

ного введения большинство стволовых клеток задерживаются в капиллярах или периферических органах, таких как легкие, печень и селезенка [69]. Существуют и другие ограничения клеточной терапии (в первую очередь, низкая выживаемость трансплантированных клеток, снижение их регенераторного потенциала при пассивировании *in vitro*, возможные иммунологические осложнения, сложность хранения и т.д.), большинство из которых могут быть преодолены заменой клеточной терапии на бесклеточную, основу которой составляют факторы роста/цитокины и ВВ, продуцируемые клетками, в частности МСК.

Следует отметить, что ВВ, содержащие широкий набор нейропротективных и прорегенераторных молекул, могут продуцировать не только МСК. Недавние исследования показали, что ВВ, полученные из НСК, вводимые как в пределах, так и вне терапевтического окна тромболизиса, приводили к значительному уменьшению объема ишемического повреждения мозга, демонстрируя лучшие терапевтические эффекты в сравнении с ВВ, выделенными из МСК [70]. Модифицированные ВВ НСК, “нагруженные” триодотирином (важным фактором для развития олигодендроцитов) стимулировали ремиелинизацию при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите в модели рассеянного склероза на животных [71]. Кроме того, был разработан инъекционный гидрогель на основе гиалуроновой кислоты для доставки ВВ НСК в головной мозг после инсульта [72]. Однако, учитывая этические и методические вопросы, связанные с выделением НСК, данные клетки не являются оптимальным выбором в качестве источника терапевтических ВВ. Получение НСК из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иНСК) могло бы стать решением данной проблемы, но массовое производство иНСК-ВВ для клинического использования все еще является нетривиальной задачей. По-видимому, одним из наиболее доступных источников ВВ для терапии мозговой ткани после повреждения являются МСК, выделенные из костного мозга, жировой ткани или пупочного канатика.

В широком спектре исследований был показан нейропротекторный эффект ВВ МСК на различных доклинических моделях неврологических нарушений [73–75]. Полученные в ходе этих исследований данные создали предпосылки для клинических исследований (КИ) препаратов на основе ВВ МСК. Так, на данный момент зарегистрированы КИ терапевтических средств на основе ВВ для коррекции следующих неврологических расстройств: NCT04388982 (болезнь Альцгеймера), NCT03384433 (цереброваскулярное расстройство) и NCT05490173 (нарушения развития нервной системы). В этих КИ использовались ВВ, выделенные из МСК разных тканей, и при-

менялись разные пути введения: для лечения болезни Альцгеймера использовались МСК жировой ткани (интраназальный путь введения), в то время как для терапии цереброваскулярных нарушений – МСК костного мозга (внутривенный путь введения). В КИ NCT03384433 (цереброваскулярные расстройства) был применен подход генной терапии – использовались ВВ аллогенных МСК, трансфицированные miR-124. Согласно данным ресурса Clinicaltrials.gov, продолжается набор в группы исследования и полученные в ходе КИ результаты пока закрыты.

ПЕРСПЕКТИВЫ, ВОЗМОЖНОСТИ И ОГРАНИЧЕНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ И ПРЕПАРАТОВ НА ИХ ОСНОВЕ

Состав и терапевтические свойства везикул зависят от свойств культуры клеток-продуцентов и условий культивирования. Идеальными источниками ВВ для стимуляции восстановления ЦНС кажутся НСК или клетки глии ввиду их высокого потенциала к нейрогенной дифференцировке и поддержанию ниши НСК [76–78]. Однако ввиду существующих этических и медицинских ограничений при получении данных типов клеток высока потребность в альтернативных источниках столовых клеток с аналогичным регенераторным потенциалом. Перспективными источниками считаются МСК, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (иПСК) или их производные. Было показано, что ВВ из этих источников обладают сходным регенеративным действием на мозг, при этом могут быть получены путем минимально инвазивных процедур [79–81]. В экспериментальных статьях и обзорах последних лет активно проводятся сравнения клеток различных источников, однако четкого консенсуса по данному вопросу на сегодняшний день не существует [82, 83].

Помимо тканевого источника немаловажным является и “качество” ниши клеток-продуцентов ВВ. Показано, что при выделении из “поврежденной” ниши клетки могут иметь т.н. “активированное” состояние и кардинально изменять состав своего секрета [84–86]. Так, например, показано, что ВВ из МСК, выделенных из нормальной или опухолевой ниши имеют противоположный эффект на развитие опухоли, ингибируя или стимулируя его, соответственно [85]. В составе ВВ, выделенных из клеток мозга мыши после моделирования его травматического повреждения, экспрессия miRНК-212 снижалась, в то время как miRНК-21, miRНК-146, miRНК-7a и miRНК-7b значительно увеличивались по сравнению с ВВ от контрольных клеток, что может приводить к активации микроглии [86].

Другим важным фактором, влияющим на качество получаемых ВВ, является возраст донора, от которого получены клетки-продуценты. Показано, что ВВ от клеток, выделенных из тканей взрослых и молодых пациентов, по-разному влияют на регенерацию. Например, ВВ из старых тканей хуже поглощаются клетками-реципиентами [87], имеют сниженную способность к регуляции иммунного ответа [88,89] и дифференцировки клеток [90,91]. Также известно, что по мере старения нейроны демонстрируют снижение своей способности к микро- и макроаутофагии, что приводит к накоплению больших мультивезикулярных телец, заполненных везикулами, большей продукции ВВ такими нейронами, при этом как это влияет на состав ВВ не установлено [92].

Подходы к усилению продукции везикул. Современная терапия зачастую предполагает повторное введение высоких доз ВВ. Поэтому ключевыми при работе с клетками-продуцентами ВВ на сегодняшний день являются методы, позволяющие количественно увеличивать секрецию ВВ клетками. Известным является тот факт, что добавление ряда веществ к культурам клеток-продуцентов приводит к увеличению секреции ВВ. Так, ранее в нашем коллективе было показано, что добавление фактора роста, полученного из тромбоцитов (PDGF-BB) [93], в культуральную среду МСК стимулирует секрецию ВВ этими клетками и увеличивает их ангиогенные свойства. Активация Src сигнального пути также способствует образованию везикул в компартменте мультивезикулярных телец, что приводит к усилению секреции экзосом [94]. Ряд препаратов, таких как метформин, гепараназа или уролитин А и В потенциально могут способствовать биогенезу и секреции экзосом [95–97]. Существуют данные о том, что культивирование МСК в присутствии экстракта нормального или ишемизированного мозга крысы в сравнении с контрольной средой, содержащей ДМЕМ и фетальную бычью сыворотку, приводило к увеличению секреции микроРНК, связанных с нейрогенезом (миРНК-134, miRНК-137 и miRНК-184), а ВВ, полученные таким способом обладали более выраженными нейротропными свойствами по сравнению с ВВ от МСК, культивированных в контрольной среде [98, 99].

Другим широко используемым подходом для увеличения секреторной активности клеток является 3D-культивирование в виде сфероидов как на гидрофобных покрытиях, так и в специальных U-образных планшетах или в биореакторах [100–102]. В ряде работ было показано, что культивирование МСК в виде сфероидов приводит не только к увеличению количества секретируемых ВВ, но и к повышению в них содержания нейротропных, противовоспалительных и антиапоптотических факторов по сравнению с ВВ, по-

лученными от 2D-адгезивных монослойных культур МСК [103]. Протеомный анализ ВВ-МСК также подтверждает, что 3D-культивирование МСК увеличивает секрецию ряда важнейших нейротрофических молекул, включая BDNF, VEGF, NGF, IGF-1, а также микроРНК-16. Показано, что секретом таких клеток увеличивает уровень пролиферации НСК и стимулирует их дифференцировку в нейроны *in vivo* и *in vitro* [104, 105].

Активно разрабатываемым направлением является управление секрецией ВВ через белки, вовлеченные в их биогенез [106, 107]. Так, гиперэкспрессия адаптероподобного белка KIBRA, стабилизирующего белок Rab27a, приводит к увеличению секреции ВВ в клетках mouse hippocampal neuronal cell line (HT22) [108], а подавление белка Rab35 в олигодендроцитах приводит к внутриклеточному накоплению эндосомальных везикул, что нарушает докинг MBV и секрецию экзосом [107].

Экспериментально было установлено, что гиперэкспрессия белков комплекса ESCRT, таких как TSG101, и Alix не приводит к увеличению секреции экзосом (30–100 нм), в отличие от гиперэкспрессии CD9 в ряде клеток, в частности в линии клеток нейроblastомы человека SH-SY5Y [109]. В другом исследовании было показано, что трансфекция клеток-продуцентов трицистронным плазмидным вектором, обеспечивающим комбинированную экспрессию металлопротеиназы STEAP3 (Six-Transmembrane Epithelial Antigen of Prostate 3), синдекана-4 (SDC4) и фрагмента l-аспаратоксидазы (NadB), приводила к увеличению продукции ВВ различными типами клеток примерно в 15–40 раз [110]. Трансплантация таких клеток-продуцентов мышам, моделирующим болезнь Паркинсона, снижала у последних проявления 6-оксидопамин-индуцированного нейровоспаления [110].

Управление уровнем отдельных днРНК также рассматривается как один из подходов к увеличению продукции ВВ. Так, было показано, что днРНК Plasmacytoma Variant Translocation 1 (PVT1) и NOX transcript antisense RNA (NOTAIR) активно вовлечены в регуляцию секреции ВВ, а гиперэкспрессия данных днРНК способны приводить к увеличению секреции ВВ путем стимулирования VAMP3-Rab опосредованной транспортировки мультивезикулярных тел (MVB) к плазматической мембране, их докингу и слиянию с плазматической мембраной [111, 112].

С целью усиления продукции ВВ также разрабатываются подходы физического воздействия на клетки, а ряд из них, предположительно, позволит манипулировать продукцией ВВ локально даже в живом организме. К таким воздействиям относятся низкоинтенсивное лазерное облучение (low-level laser irradiation (LLLI) [113], гамма-

ионизирующее излучение [114], обработка электрическим током низкой мощности и т.д. Предположительно, данные воздействия приводят к активации апоптоза и/или аутофагии, что в свою очередь активирует ряд белков, вовлеченных в биогенез ВВ – Alix, Rab27a, Rab27b, TSPA8 и CD63 [113, 114]. Оксидативный стресс [115], гипоксия [116], культивирование в биореакторах [117] или на жестком матриксе [118] также являются факторами, способными приводить к увеличению секреции ВВ.

Впрочем, следует отметить, что в большинстве таких работ не обсуждается изменение состава ВВ, и как следствие, возможное изменение их терапевтического потенциала. Поэтому большинство описанных выше способов стимуляции продукции ВВ требуют дальнейшей тщательной проверки. Вероятно, некоторые из предложенных подходов существенно не изменяют состав ВВ [119], в то время как при других такие изменения могут быть весьма существенными [120, 121].

Генетическая модификация клеточной линии-продуцента с целью направленной загрузки внеклеточных везикул и усиления их направленного докинга. ВВ являются продуктом биологического происхождения и поэтому характеризуются широкой вариабельностью своего состава и содержанием, а также обладают ограниченной специфичностью, а в ряде случаев и недостаточной эффективностью [20, 31]. Современные генноинженерные подходы позволяют преодолеть эти ограничения, сделав препараты на основе ВВ более эффективными, стандартными по составу и коммерчески доступными.

Так, понимание механизмов сортировки содержимого во ВВ, открывает возможность увеличивать эффективность упаковки в них необходимых белков, кодирующих и регуляторных РНК, как для исследовательских целей, так и с целью разработки высокоэффективных и специфичных лекарственных препаратов. Практически все эти подходы предполагают внесение в первичную последовательность белка или РНК сайтов, распознаваемых системой сортировки. Так, было показано, что внесение WW-домена способствует загрузке необходимых белков во ВВ (M2 белок вируса гриппа А, Cre-рекомбиназа, др.) [122, 123]. Внесение GGAG-мотива в последовательность микроРНК увеличивает ее содержание в экзосомах клеток-продуцентов [124]. Любопытный подход к упаковке мРНК во ВВ был предложен И.В. Зубаревым и коллегами [125]. Он базируется на способности ряда белков, в том числе и белков вирусного происхождения (ARC и PEG10 белки эукариот, Nef и Gag белки ВИЧ-1), локализованных в экзосомах, связывать определенные РНК последовательности.

Генноинженерные подходы могут позволить увеличить специфичность ВВ и увеличить эффективность их докинга с целевым типом клеток. Поскольку слияние ВВ с клетками во многом определяется белок-белковыми (или лиганд-рецепторными) взаимодействиями, то, экспрессируя на поверхности ВВ соответствующие белки, можно попытаться управлять эффективностью и специфичностью данного процесса. Принципиальная возможность этого подтверждается наличием аналогичных природных механизмов, благодаря которым ВВ проникают в целевые клетки (ICAM1-Интегрины, Лектин-Протеоглики, gD-Nectin1, gHgL-EphA2 и т.д.) [125, 126], а также рядом успешных экспериментальных разработок. Так, на *in vivo* модели было показано, что экспрессия на поверхности ВВ заякоренной молекулы EGF или ее аналога полипептида GE11 (YHWYGYTPQNVI), способного распознавать EGFR, позволяет более специфично и эффективно доставлять экзосомы, содержащие лекарственный препарат, в ткани EGFR-экспрессирующей опухоли [127]. Экзосомы, экспрессирующие трансмембранный домен экзосома-специфичного белка Lamp2b, сшитый с кардиомиоцит-специфичным пептидом WLSEAGPVVTVRALRGTGSW, более эффективно накапливались в миокарде и защищали кардиомиоциты от гибели в экспериментальной модели инфаркта миокарда крыс [128]. Потенциально аналогичные подходы можно использовать для коррекции и остановки патологических процессов, протекающих в нервной ткани после повреждения, таких как гибель нейронов, нарушение ГЭБ, нейровоспаление и т.п.

Накопленный опыт позволяет предположить, что комбинированная генная инженерия белков, входящих в состав содержимого и мембран экзосом, а также связывающихся с ними РНК, дает возможность получать относительно стандартные по своему составу препараты ВВ, содержащие высокие титры искомым РНК и белков, что может быть использовано для стимуляции регенеративных процессов и даже коррекции широкого спектра наследственных патологий.

Ограничения применения внеклеточных везикул и препаратов на их основе. ВВ и препараты на их основе, как и любой инструмент, имеют свои ограничения, которые необходимо выявить перед широкомасштабной трансляцией данной технологии в клиническую практику.

Серьезной проблемой применения ВВ является нестабильность их терапевтического эффекта. Так, в ряде исследований было показано, что ВВ МСК могут как стимулировать процессы ангиогенеза, так и проявлять антиангиогенные эффекты в провоспалительном микроокружении [129, 130]. Такая нестабильность терапевтического эффекта ВВ может быть обусловлена множеством

причин, включая источник МСК, возраст и здоровье донора, методы культивирования и кондиционирования и т.п. Другой возможной причиной нестабильности терапевтических эффектов ВВ МСК является их гетерогенность. В недавнем исследовании авторами рекомендована общая стратегия оптимизации процесса выделения МСК для получения более качественных и однородных по составу ВВ МСК [131, 132]: выбор оптимальных субпопуляций ВВ из везикулярной фракции секрета МСК для лечения различных заболеваний предположительно повысит стабильность их терапевтических эффектов. С другой стороны, понимание материальных основ данной гетерогенности и ее использование может открыть еще больше возможностей для терапии ряда патологий, а стабильности состава фракции ВВ МСК возможно достичь путем подбора условий и применением стандартизированных протоколов для выделения, культивирования и кондиционирования культур МСК. Следует отметить, что научное сообщество уделяет достаточно внимания вопросам стандартизации подходов к получению, характеристике и использованию ВВ, так, Международным обществом по изучению внеклеточных везикул разработаны рекомендации по минимальным требованиям, которые должны предъявляться к описанию ВВ в контексте научного исследования [124].

Помимо упомянутых выше проблем масштабирования данной технологии и стандартизации состава ВВ, которые отчасти могут быть решены с использованием современных методов культивирования клеток, генной инженерии или химических технологий, необходимо помнить о возможных иммунологических и онкологических осложнениях применения такого рода препаратов. Поскольку ВВ содержат молекулы, участвующие в иммунологических процессах (комплексы МНС I/II, ко-стимуляторные молекулы CD80, CD86 и CD40, молекулы адгезии ICAM-1, FasL и др.) [20–22], а также молекулы, стимулирующие процессы регенерации (заякоренные на мембране факторы роста, их мРНК, прорегенеративные и антиапоптотические микроРНК и т.д.), существует вероятность того, что введение ВВ может стимулировать развитие иммунных реакций или стимулировать прогрессию и метастазирование существующих опухолей [20–22, 85]. Причем степень выраженности такого эффекта может зависеть от источника ВВ, их дозы, способа и кратности введения [5, 133]. Это следует учитывать при планировании доклинических и клинических испытаний таких препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Совокупность накопленных данных позволяет утверждать, что внеклеточные везикулы (несмотря

на ряд существующих ограничений) являются действенным и относительно безопасным инструментом для коррекции генетической программы клеток и тканей, как для стимуляции регенеративных процессов, так и для лечения наследственных патологий. Прежде всего это обусловлено биомиметической природой данных продуктов. Широкие возможности оптимизации специфичности и терапевтической активности внеклеточных везикул делают их практически безальтернативной платформой для создания широкого спектра биологических лекарственных препаратов (в том числе и для лечения заболеваний нервной системы) уже в ближайшем будущем.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-75-30007, <https://rscf.ru/project/19-75-30007/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Yousufuddin M., Young N.* // Aging (Albany NY). 2019. V. 11. № 9. P. 2542–2544. <https://doi.org/10.18632/aging.101931>
2. *Bolshakov A.P., Tretyakova L.V., Kvichansky A.A., Gulyaeva N.V.* // Biochemistry (Mosc.). 2021. V. 86. № 2. P. 156–167. <https://doi.org/10.1134/S0006297921020048>
3. *Gladstone D.J., Lindsay M.P., Douketis J., Smith E.E., Dowlatshahi D., Wein T., Bourgoin A., Cox J., Falconer J.B., Graham B.R., Labrie M., McDonald L., Mandzia J., Ngui D., Pageau P., Rodgerson A., Semchuk W., Tebbutt T., Tuchak C., van Gaal S., Villaluna K., Foley N., Coutts S., Mountain A., Gubitz G., Udell J.A., McGuff R., Heran MKS, Lavoie P., Poppe A.Y.* // Can. J. Neurol. Sci. 2022. V. 49. № 3. P. 315–337. <https://doi.org/10.1017/cjn.2021.127>
4. *Tuo Q.Z., Zhang S.T., Lei P.* // Med. Res. Rev. 2022. V. 42. № 1. P. 259–305. <https://doi.org/10.1002/med.21817>
5. *Chrostek M.R., Fellows E.G., Crane A.T., Grande A.W., Low W.C.* // Brain Res. 2019. V. 1722. P. 146362. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2019.146362>
6. *Karagyaour M., Dzhauari S., Basalova N., Aleksandrushkina N., Sagaradze G., Danilova N., Malkov P., Popov V., Skryabina M., Efimenko A., Tkachuk V.* // Pharmaceutics. 2021. V. 13. № 12. P. 2031. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13122031>
7. *Pischiutta F., Caruso E., Cavaleiro H., Salgado A.J., Loane D.J., Zanier E.R.* // Exp. Neurol. 2022. V. 357. P. 114199. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2022.114199>
8. *Cunningham C.J., Redondo-Castro E., Allan S.M.* // J. Cereb. Blood Flow Metab. 2018. V. 38. № 8. P. 1276–1292. <https://doi.org/10.1177/0271678X18776802>
9. *Asgari Taii A., Nasoohi S., Hassanzadeh G., Kadivar M., Dargahi L., Farahmandfar M.* // Biomed. Pharmacother. 2021. V. 140. P. 111709. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111709>
10. *Muhammad S.A.* // Biofactors. 2019. V. 45. № 6. P. 880–891. <https://doi.org/10.1002/biof.1563>
11. *Baez-Jurado E., Hidalgo-Lanussa O., Barrera-Bailón B., Sahebkar A., Ashraf G.M., Echeverria V., Barreto G.E.* // Mol. Neurobiol. 2019. V. 56. № 10. P. 6902–6927. <https://doi.org/10.1007/s12035-019-1570-x>
12. *Dzhauari S., Litvinova S., Efimenko A., Aleksandrushkina N., Basalova N., Abakumov M., Danilova N., Malkov P., Balabanyan V., Bezuglova T., Balayants V., Mnikhovich M., Gulyaev M., Skryabina M., Popov V., Stambolsky D., Voronina T., Tkachuk V., Karagyaour M.* // Biomedicines. 2022. V. 10. № 6. P. 1346. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10061346>
13. *Pardridge W.M.* // Adv. Exp. Med. Biol. 2002. V. 513. P. 397–430. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0123-7_15
14. *Nooshabadi V.T., Mardpour S., Yousefi-Ahmadipour A., Allahverdi A., Izadpanah M., Daneshimehr F., Ai J., Banafshe H.R., Ebrahimi-Barough S.* // J. Cell. Biochem. 2018. V. 19. № 10. P. 8048–8073. <https://doi.org/10.1002/jcb.26726>
15. *Thalakiriyawa D.S., Jayasooriya P.R., Dissanayaka W.L.* // Curr. Mol. Med. 2022. V. 22. № 2. P. 98–119. <https://doi.org/10.2174/156652402166621021114453>
16. *Saint-Pol J., Gosselet F., Duban-Deweere S., Pottiez G., Karamanos Y.* // Cells. 2020. V. 9. № 4. P. 851. <https://doi.org/10.3390/cells9040851>
17. *Ramos-Zaldívar H.M., Polakovicova I., Salas-Huenuleo E., Corvalán A.H., Kogan M.J., Yefi C.P., Andia M.E.* // Fluids Barriers CNS. 2022. V. 19. № 1. P. 60. <https://doi.org/10.1186/s12987-022-00359-3>
18. *Osteikoetxea X., Silva A., Lázaro-Ibáñez E., Salmond N., Shatnyeva O., Stein J., Schick J., Wren S., Lindgren J., Firth M., Madsen A., Mayr L.M., Overman R., Davies R., Dekker N.* // J. Extracell. Vesicles. 2022. V. 11. № 5. P. e12225. <https://doi.org/10.1002/jev2.12225>
19. *Richter M., Vader P., Fuhrmann G.* // Adv. Drug Deliv. Rev. 2021. V. 173. P. 416–426. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.03.020>
20. *Yáñez-Mó M., Siljander P.R., Andreu Z., Zavec A.B., Borràs F.E., Buzas E.I., Buzas K., Casal E., Cappello F., Carvalho J., Colás E., Cordeiro-da Silva A., Fais S., Falcon-Perez J.M., Ghobrial I.M., Giebel B., Gimona M., Graner M., Gursel I., Gursel M., Heegaard N.H., Hendrix A., Kierulf P., Kokubun K., Kosanovic M., Kralj-Iglic V., Krämer-Albers E.M., Laitinen S., Lässer C., Lener T., Ligeti E., Linē A., Lipps G., Llorente A., Lötvall J., Manček-Keber M., Marcilla A., Mittelbrunn M., Nazarenko I., Nolte-’t Hoen E.N., Nyman T.A., O’Driscoll L., Olivan M., Oliveira C., Pállinger É., Del Portillo H.A., Reventós J., Rigau M., Rohde E., Sammar M., Sánchez-Madrid F., Santarém N., Schallmoser K., Ostendorf M.S., Stoorvogel W., Stukelj R.,*

- Van der Grein S.G., Vasconcelos M.H., Wauben M.H., De Wever O.* // *J. Extracell. Vesicles.* 2015. V. 4. P. 27066.
<https://doi.org/10.3402/jev.v4.27066>
21. *Kao C.Y., Papoutsakis E.T.* // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2019. V. 60. P. 89–98.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.01.005>
 22. *EL Andaloussi S., Mäger I., Breakefield X.O., Wood M.J.* // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013. V. 12. № 5. P. 347–357.
<https://doi.org/10.1038/nrd3978>
 23. *Bordanaba-Florit G., Royo F., Kruglik S.G., Falcón-Pérez J.M.* // *Nat. Protoc.* 2021. V. 16. № 7. P. 3163–3185.
<https://doi.org/10.1038/s41596-021-00551-z>
 24. *Lai C.P., Kim E.Y., Badr C.E., Weissleder R., Mempel T.R., Tannous B.A., Breakefield X.O.* // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 7029.
<https://doi.org/10.1038/ncomms8029>
 25. *van Niel G., Charrin S., Simoes S., Romao M., Rochin L., Saftig P., Marks M.S., Rubinstein E., Raposo G.* // *Dev. Cell.* 2011. V. 21. № 4. P. 708–721.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.08.019>
 26. *Mathieu M., Martin-Jaular L., Lavieu G., Théry C.* // *Nat. Cell. Biol.* 2019. V. 21. № 1. P. 9–17.
<https://doi.org/10.1038/s41556-018-0250-9>
 27. *Johnstone R.M., Adam M., Hammond J.R., Orr L., Turbide C.* // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. № 19. P. 9412–9420.
 28. *Colombo M., Moita C., van Niel G., Kowal J., Vigneron J., Benaroch P., Manel N., Moita L.F., Théry C., Raposo G.* // *J. Cell. Sci.*, 2013. V. 126. № 24. P. 5553–5565.
<https://doi.org/10.1242/jcs.128868>
 29. *Colombo M., Raposo G., Théry C.* // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2014. V. 30. P. 255–289.
<https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>
 30. *Tang Y.T., Huang Y.Y., Zheng L., Qin S.H., Xu X.P., An T.X., Xu Y., Wu Y.S., Hu X.M., Ping B.H., Wang Q.* // *Int. J. Mol. Med.* 2017. V. 40. № 3. P. 834–844.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3080>
 31. *Akers J.C., Gonda D., Kim R., Carter B.S., Chen C.C.* // *J. Neurooncol.* 2013. V. 113. № 1. P. 1–11.
<https://doi.org/10.1007/s11060-013-1084-8>
 32. *Hurley J.H.* // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2010. V. 45. № 6. P. 463–487.
<https://doi.org/10.3109/10409238.2010.502516>
 33. *Gruenberg J.* // *Traffic.* 2020. V. 21. № 1. P. 76–93.
<https://doi.org/10.1111/tra.12715>
 34. *Liu C.C., Liu Y.Y., Zhou J.F., Chen X., Chen H., Hu J.H., Chen J., Zhang J., Sun R.C., Wei J.C., Go Y.Y., Morita E., Zhou B.* // *PLoS Pathog.* 2022. V. 18. № 2. P. e1010294.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010294>
 35. *Erpapazoglou Z., Dhaoui M., Pantazopoulou M., Giordano F., Mari M., Léon S., Raposo G., Reggiori F., Haguenaer-Tsapis R.* // *Mol. Biol. Cell.* 2012. V. 23. № 11. P. 2170–2183.
<https://doi.org/10.1091/mbc.E11-10-0891>
 36. *Boase N.A., Kumar S.* // *Gene.* 2015. V. 557. № 2. P. 113–122.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2014.12.020>
 37. *Gareau J.R., Lima C.D.* // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2010. V. 11. № 12. P. 861–871.
<https://doi.org/10.1038/nrm3011>
 38. *Marie P.P., Fan S.J., Mason J., Wells A., Mendes C.C., Wainwright S.M., Scott S., Fischer R., Harris A.L., Wilson C., Goberdhan D.C.I.* // *J. Extracell. Vesicles.* 2023. V. 12. № 3. P. e12311.
<https://doi.org/10.1002/jev2.12311>
 39. *Villarroya-Beltri C., Gutiérrez-Vázquez C., Sánchez-Cabo F., Pérez-Hernández D., Vázquez J., Martín-Cofreces N., Martínez-Herrera D.J., Pascual-Montano A., Mittelbrunn M., Sánchez-Madrid F.* // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 2980.
<https://doi.org/10.1038/ncomms3980>
 40. *Martínez-Lorenzo M.J., Anel A., Gamen S., Monlen I., Lasiera P., Larrad L., Piñeiro A., Alava M.A., Naval J.* // *J. Immunol.* 1999. V. 163. № 3. P. 1274–81.
 41. *Batista B.S., Eng W.S., Pilobello K.T., Hendricks-Muñoz K.D., Mahal L.K.* // *J. Proteome Res.*, 2011. V. 10. № 10. P. 4624–4633.
<https://doi.org/10.1021/pr200434y>
 42. *Skriner K., Adolph K., Jungblut P.R., Burmester G.R.* // *Arthritis Rheum.* 2006. V. 54. № 12. P. 3809–3814.
<https://doi.org/10.1002/art.22276>
 43. *Moreno-Gonzalo O., Fernandez-Delgado I., Sanchez-Madrid F.* // *Cell. Mol. Life Sci.* 2018. V. 75. № 1. P. 1–19.
<https://doi.org/10.1007/s00018-017-2690-y>
 44. *Anand S., Samuel M., Kumar S., Mathivanan S.* // *Biochim Biophys. Acta Proteins Proteom.* 2019. V. 1867. № 12. P. 140203.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.02.005>
 45. *Seo M.D., Seok S.H., Kim J.H., Choi J.W., Park S.J., Lee B.J.* // *Life (Basel).* 2021. V. 11. № 5. P. 379.
<https://doi.org/10.3390/life11050379>
 46. *Kunadt M., Eckermann K., Stuenkel A., Gong J., Russo B., Strauss K., Rai S., Kügler S., Falomir Lockhart L., Schwalbe M., Krumova P., Oliveira L.M., Bähr M., Möbius W., Levin J., Giese A., Kruse N., Mollenhauer B., Geiss-Friedlander R., Ludolph A.C., Freischmidt A., Feiler M.S., Danzer K.M., Zweckstetter M., Jovin T.M., Simons M., Weishaupt J.H., Schneider A.* // *Acta Neuropathol.* 2015. V. 129. № 5. P. 695–713.
<https://doi.org/10.1007/s00401-015-1408-1>
 47. *Saman S., Kim W., Raya M., Visnick Y., Miro S., Saman S., Jackson B., McKee A.C., Alvarez V.E., Lee N.C., Hall G.F.* // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 6. P. 3842–3849.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M111.277061>
 48. *Verderio C., Gabrielli M., Giussani P.* // *J. Lipid Res.* 2018. V. 59. № 8. P. 1325–1340.
<https://doi.org/10.1194/jlr.R083915>
 49. *Halova I., Draber P.* // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2016. V. 4. P. 43.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00043>
 50. *Fabbiano F., Corsi J., Gurrieri E., Trevisan C., Notarangelo M., D'Agostino V.G.* // *J. Extracell. Vesicles.* 2020. V. 10(2). P. e12043.
<https://doi.org/10.1002/jev2.12043>
 51. *Wang M., Yu F., Li P., Wang K.* // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2020. V. 21. P. 367–383.
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2020.06.008>

52. Sharma P, Mesci P, Carromeu C, McClatchy D.R., Schiapparelli L., Yates J.R., Muotri A.R., Cline H.T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V. 116. P. 16086–16094.
53. You Y, Borgmann K, Edara V.V., Stacy S., Ghorpade A., Ikezu T. // J. Extracell. Vesicles. 2019. V. 9. № 1. P. 1706801.
<https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1706801>
54. Donoso-Quezada J, Ayala-Mar S, González-Valdez J. // Crit. Rev. Biotechnol. 2020. V. 40. № 6. P. 804–820.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1785385>
55. Elsharkasy O.M., Nordin J.Z., Hagey D.W., de Jong O.G., Schiffelers R.M., Andaloussi S.E., Vader P. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2020. V. 159. P. 332–343.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.04.004>
56. Bulbake U, Doppalapudi S, Kommineni N, Khan W. // Pharmaceutics. 2017. V. 9. № 2. P. 12.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>
57. Sercombe L, Veerati T, Moheimani F, Wu S.Y., Sood A.K., Hua S. // Front. Pharmacol. 2015. V. 6. P. 286.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00286>
58. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T.L., Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, Molina H, Kohsaka S, Di Giannatale A, Ceder S, Singh S, Williams C, Soplop N, Uryu K, Pharmed L, King T, Bojmar L, Davies A.E., Ararso Y, Zhang T, Zhang H, Hernandez J, Weiss J.M., Dumont-Cole V.D., Kramer K, Wexler L.H., Narendran A, Schwartz G.K., Healey J.H., Sandstrom P, Latori K.J., Kure E.H., Grandgenett P.M., Hollingsworth M.A., de Sousa M, Kaur S, Jain M, Mallya K, Batra S.K., Jarnagin W.R., Brady M.S., Fodstad O, Muller V, Pantel K, Minn A.J., Bissell M.J., Garcia B.A., Kang Y, Rajasekhar V.K., Ghajar C.M., Matei I, Peinado H, Bromberg J, Lyden D. // Nature. 2015. V. 527. № 7578. P. 329–335.
<https://doi.org/10.1038/nature15756>
59. Osawa S, Kurachi M, Yamamoto H, Yoshimoto Y, Ishizaki Y. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017. V. 488. № 1. P. 232–238.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.05.049>
60. Murphy D.E., de Jong O.G., Brouwer M., Wood M.J., Lavieu G, Schiffelers R.M., Vader P. // Exp. Mol. Med. 2019. V. 51. № 3. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1038/s12276-019-0223-5>
61. Kuriakose D, Xiao Z. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 20. P. 7609.
<https://doi.org/10.3390/ijms21207609>
62. Borgens R.B., Liu-Snyder P. // Q. Rev. Biol. 2012. V. 87. № 2. P. 89–127.
<https://doi.org/10.1086/665457>
63. Lopez J.A., Denkova M., Ramanathan S., Dale R.C., Brilot F. // Clin. Transl. Immunology. 2021. V. 10. № 7. P. e1316.
<https://doi.org/10.1002/cti2.1316>
64. Zhang Z.G., Chopp M. // Lancet Neurol. 2009. V. 8. P. 491–500.
65. Chen J, Li Y, Wang L, Zhang Z, Lu D, Lu M, Chopp M. // Stroke. 2001. V. 32. № 4. P. 1005–1011.
<https://doi.org/10.1161/01.str.32.4.1005> PMID: 11283404
66. Shariati A, Nemati R, Sadeghipour Y, Yaghoubi Y, Baghbani R, Javid K, Zamani M, Hassanzadeh A. // Eur. J. Cell. Biol. 2020. V. 99. № 6. P. 151097.
<https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2020.151097>
67. Hess D.C., Wechsler L.R., Clark W.M., Savitz S.I., Ford G.A., Chiu D., Yavagal D.R., Uchino K., Liebeskind D.S., Auchus A.P., Sen S., Sila C.A., Vest J.D., Mays R.W. // Lancet Neurol. 2017. V. 16. № 5. P. 360–368.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30046-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30046-7)
68. Chung J.W., Chang W.H., Bang O.Y., Moon G.J., Kim S.J., Kim S.K., Lee J.S., Sohn S.I., Kim Y.H. STARTING-2 Collaborators // Neurology. 2021. V. 96. № 7. P. e1012–e1023.
<https://doi.org/10.1212/WNL.00000000000011440>
69. Zhang S, Lachance B.B., Moiz B, Jia X. // J. Stroke. 2020. V. 22. P. 286–305.
70. Webb R.L., Kaiser E.E., Scoville S.L., Thompson T.A., Fatima S, Pandya C, Sriram K, Swetenburg R.L., Vaibhav K, Arbab A.S., Baban B, Dhandapani K.M., Hess D.C., Hoda M.N., Stice S.L. // Transl. Stroke Res. 2018. V. 9. № 5. P. 530–539.
<https://doi.org/10.1007/s12975-017-0599-2>
71. Xiao Y, Tian J, Wu W.C., Gao Y.H., Guo Y.X., Song S.J., Gao R, Wang L.B., Wu X.Y., Zhang Y, Li X. // Bioact. Mater. 2021. V. 9. P. 373–384.
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.07.017>
72. Jiang Y, Wang R, Wang C, Guo Y, Xu T, Zhang Z, Yang G.Y., Xu H, Tang Y. // Adv. Healthc Mater. 2022. V. 11. № 22. P. e2201150.
<https://doi.org/10.1002/adhm.202201150>
73. Deng M, Xiao H, Zhang H, Peng H, Yuan H, Xu Y, Zhang G, Hu Z. // Front. Cell. Neurosci. 2017. V. 11. P. 205.
<https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00205>
74. Liu X, Zhang M, Liu H, Zhu R, He H, Zhou Y, Zhang Y, Li C, Liang D, Zeng Q, Huang G. // Exp. Neurol. 2021. V. 341. P. 113700.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2021.113700>
75. Zhang Y, Liu J, Su M, Wang X, Xie C. // Stem. Cell. Res. Ther. 2021. V. 12. № 1. P. 111.
<https://doi.org/10.1186/s13287-020-02091-x>
76. Webb R.L., Kaiser E.E., Jurgielewicz B.J., Spellacy S., Scoville S.L., Thompson T.A., Swetenburg R.L., Hess D.C., West F.D., Stice S.L. // Stroke. 2018. V. 49. № 5. P. 1248–1256.
<https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.020353>
77. Webb R.L., Kaiser E.E., Scoville S.L., Thompson T.A., Fatima S, Pandya C, Sriram K, Swetenburg R.L., Vaibhav K, Arbab A.S., Baban B, Dhandapani K.M., Hess D.C., Hoda M.N., Stice S.L. // Transl. Stroke Res. 2018. V. 9. № 5. P. 530–539.
<https://doi.org/10.1007/s12975-017-0599-2>
78. Pascual M, Ibáñez F, Guerri C. // Neural Regen Res., 2020. V. 15. № 5. P. 796–801.
<https://doi.org/10.4103/1673-5374.268893>
79. Upadhyay R, Madhu L.N., Attaluri S, Gitaí D.L.G., Pinson M.R., Kodali M., Shetty G, Zanirati G, Kumar S, Shuai B, Weintraub S.T., Shetty A.K. // J. Extracell. Vesicles. 2020. V. 9. № 1. P. 1809064.
<https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1809064>
80. Doepfner T.R., Herz J, Görgens A., Schlechter J, Ludwig A.K., Radtke S, de Miroshedji K, Horn P.A., Giebel B, Hermann D.M. // Stem Cells Transl. Med.

2015. V. 4. № 10. P. 1131–1143.
<https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0078>
81. Xia Y., Ling X., Hu G., Zhu Q., Zhang J., Li Q., Zhao B., Wang Y., Deng Z. // *Stem Cell. Res. Ther.* 2020. V. 11. № 1. P. 313.
<https://doi.org/10.1186/s13287-020-01834-0>
 82. Gao Y., Wang C., Jin F., Han G., Cui C. // *Tissue Cell.* 2022. V. 76. P. 101772.
<https://doi.org/10.1016/j.tice.2022.101772>
 83. Cai J., Wu J., Wang J., Li Y., Hu X., Luo S., Xiang D. // *Cell Biosci.* 2020. V. 10. P. 69.
<https://doi.org/10.1186/s13578-020-00427-x>
 84. Lemos D.R., Duffield J.S. // *Sci. Transl. Med.* 2018. V. 10. № 426. P. ean5174.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aan5174>
 85. Attar-Schneider O., Dabbah M., Drucker L., Gottfried M. // *Cell Signal.* 2020. V. 65. P. 109456.
<https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109456>
 86. Harrison E.B., Hochfelder C.G., Lamberty B.G., Meays B.M., Morsey B.M., Kelso M.L., Fox H.S., Yelamanchili S.V. // *FEBS Open Bio.* 2016. V. 6. № 8. P. 835–846.
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.12092>
 87. Huang R., Qin C., Wang J., Hu Y., Zheng G., Qiu G., Ge M., Tao H., Shu Q., Xu J. // *Aging (Albany NY).* 2019. V. 11. № 18. P. 7996–8014.
<https://doi.org/10.18632/aging.102314>
 88. Fafián-Labora J., Lesende-Rodríguez I., Fernández-Pernas P., Sangiao-Alvarellos S., Monserrat L., Arntz O.J., van de Loo F.J., Mateos J., Arufe M.C. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 43923.
<https://doi.org/10.1038/srep43923>
 89. Huang R., Qin C., Wang J., Hu Y., Zheng G., Qiu G., Ge M., Tao H., Shu Q., Xu J. // *Aging (Albany NY).* 2019. V. 11. № 18. P. 7996–8014.
<https://doi.org/10.18632/aging.102314>
 90. Davis C., Dukes A., Drewry M., Helwa I., Johnson M.H., Isales C.M., Hill W.D., Liu Y., Shi X., Fulzele S., Hamrick M.W. // *Tissue Eng. Part A.* 2017. V. 23. № 21–22. P. 1231–1240.
<https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2016.0525>
 91. Voynova E., Kulebyakin K., Grigorieva O., Novoseletskaia E., Basalova N., Alexandrushkina N., Arbatskiy M., Vigovskiy M., Sorokina A., Zinoveva A., Bakhchinyan E., Kalinina N., Akopyan Z., Tkachuk V., Tyurin-Kuzmin P., Efimenko A. // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2022. V. 10. P. 1050489.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1050489>
 92. Guix F.X., Capitán A.M., Casadomé-Perales Á., Palomares-Pérez I., López Del Castillo I., Miguel V., Goedeke L., Martín M.G., Lamas S., Peinado H., Fernández-Hernando C., Dotti C.G. // *Life Sci. Alliance.* 2021. V. 4. № 8. P. e202101055.
<https://doi.org/10.26508/lsa.202101055>
 93. Lopatina T., Bruno S., Tetta C., Kalinina N., Porta M., Camussi G. // *Cell. Commun. Signal.* 2014. V. 12. P. 26.
<https://doi.org/10.1186/1478-811X-12-26>
 94. Hikita T., Kuwahara A., Watanabe R., Miyata M., Oneyama C. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 3265.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-39882-z>
 95. Soto-Huelin B., Babiy B., Pastor O., Díaz-García M., Toledano-Zaragoza A., Frutos M.D., Espín J.C., Tomás-Barberán F.A., Busto R., Ledesma M.D. // *Neurobiol. Dis.* 2023. V. 182. P. 106141.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2023.106141>
 96. Soraya H., Sani N.A., Jabbari N., Rezaie J. // *Arch. Med. Res.* 2021. V. 52. № 2. P. 151–162.
<https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.10.007>
 97. Baietti M.F., Zhang Z., Mortier E., Melchior A., Degeest G., Geeraerts A., Ivarsson Y., Depoortere F., Coomans C., Vermeiren E., Zimmermann P., David G. // *Nat. Cell. Biol.* 2012. V. 14. № 7. P. 677–685.
<https://doi.org/10.1038/ncb2502>
 98. Choi Y.J., Li W.Y., Moon G.J., Lee P.H., Ahn Y.H., Lee G., Bang O.Y. // *J. Neurol. Sci.* 2010. V. 298. № 1–2. P. 28–34.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2010.09.003>
 99. Cha J.M., Shin E.K., Sung J.H., Moon G.J., Kim E.H., Cho Y.H., Park H.D., Bae H., Kim J., Bang O.Y. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 1171.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-19211-6>
 100. Casajuana Ester M., Day R.M. // *Pharmaceutics.* 2023. V. 15. № 2. P. 663.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020663>
 101. Xie L., Mao M., Zhou L., Zhang L., Jiang B. // *Stem Cells Int.* 2017. V. 2017. P. 2730472.
<https://doi.org/10.1155/2017/2730472>
 102. Kim M., Yun H.W., Park D.Y., Choi B.H., Min B.H. // *Tissue Eng. Regen. Med.* 2018. V. 15. № 4. P. 427–436.
<https://doi.org/10.1007/s13770-018-0139-5>
 103. Han M., Zhang Z., Liu Z., Liu Y., Zhao H., Wang B., Zhang C., Shang H., Li Y., Wang S., Xin T. // *Biomater. Adv.* 2023. V. 149. P. 213396.
<https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2023.213396>
 104. Teixeira F.G., Panchalingam K.M., Assunção-Silva R., Serra S.C., Mendes-Pinheiro B., Patrício P., Jung S., Anjo S.I., Manadas B., Pinto L., Sousa N., Behie L.A., Salgado A.J. // *Sci Rep.* 2016. V. 6. P. 27791.
<https://doi.org/10.1038/srep27791>
 105. Zhang Y., Chopp M., Zhang Z.G., Katakowski M., Xin H., Qu C., Ali M., Mahmood A., Xiong Y. // *Neurochem. Int.* 2017. V. 111. P. 69–81.
<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.08.003>
 106. Sinha S., Hoshino D., Hong N.H., Kirkbride K.C., Grega-Larson N.E., Seiki M., Tyska M.J., Weaver A.M. // *J. Cell. Biol.* 2016. V. 214. № 2. P. 197–213.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201601025>
 107. Hsu C., Morohashi Y., Yoshimura S., Manrique-Hoyos N., Jung S., Lauterbach M.A., Bakhti M., Grønborg M., Möbius W., Rhee J., Barr F.A., Simons M. // *J. Cell. Biol.* 2010. V. 189. № 2. P. 223–232.
<https://doi.org/10.1083/jcb.200911018>
 108. Song L., Tang S., Han X., Jiang Z., Dong L., Liu C., Liang X., Dong J., Qiu C., Wang Y., Du Y. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 1639.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-09720-x>
 109. Böker K.O., Lemus-Diaz N., Rinaldi Ferreira R., Schiller L., Schneider S., Gruber J. // *Mol Ther.* 2018. V. 26. № 2. P. 634–647.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.11.008>

110. Kojima R., Bojar D., Rizzi G., Hamri G.C., El-Baba M.D., Saxena P., Ausländer S., Tan K.R. & Fussenegger M. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. P. 1305.
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-03733-8>
111. Sun C., Wang P., Dong W., Liu H., Sun J., Zhao L. // *Aging (Albany NY)*. 2020. V. 12. № 11. P. 10427–10440.
<https://doi.org/10.18632/aging.103268>
112. Yang L., Peng X., Li Y., Zhang X., Ma Y., Wu C., Fan Q., Wei S., Li H., Liu J. // *Mol. Cancer*. 2019. V. 18. № 1. P. 78.
<https://doi.org/10.1186/s12943-019-0990-6>
113. Bagheri H.S., Mousavi M., Rezabakhsh A., Rezaie J., Rasta S.H., Nourazarian A., Avcı Ç.B., Tajalli H., Talebi M., Oryan A., Khaksar M., Kazemi M., Nasiri S.M., Ghaderi S., Bagca B.G., Rahbarghazi R., Sokullu E. // *Lasers Med. Sci.* 2018. V. 33. № 5. P. 1131–1145.
<https://doi.org/10.1007/s10103-018-2495-8>
114. Jabbari N., Nawaz M., Rezaie J. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 15. P. 3649.
<https://doi.org/10.3390/ijms20153649>
115. Chiaradia E., Tancini B., Emiliani C., Delo F., Pellegrino R.M., Tognoloni A., Urbanelli L., Buratta S. // *Cells*. 2021. V. 10. № 7. P. 1763.
<https://doi.org/10.3390/cells10071763>
116. Gonzalez-King H., García N.A., Ontoria-Oviedo I., Ciria M., Montero J.A., Sepúlveda P. // *Stem Cells*. 2017. V. 35. № 7. P. 1747–1759.
<https://doi.org/10.1002/stem.2618>
117. Jeske R., Liu C., Duke L., Canonicco Castro M.L., Muok L., Arthur P., Singh M., Jung S., Sun L., Li Y. // *Bioact. Mater.* 2022. V. 25. P. 732–747.
<https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.07.004>
118. Wu B., Liu D.A., Guan L., Myint P.K., Chin L., Dang H., Xu Y., Ren J., Li T., Yu Z., Jabban S., Mills G.B., Nukpezah J., Chen Y.H., Furth E.E., Gimotty P.A., Wells R.G., Weaver V.M., Radhakrishnan R., Wang X.W., Guo W. // *Nat. Cell Biol.* 2023. V. 25. № 3. P. 415–424.
<https://doi.org/10.1038/s41556-023-01092-1>
119. Sinha S., Hoshino D., Hong N.H., Kirkbride K.C., Grega-Larson N.E., Seiki M., Tyska M.J., Weaver A.M. // *J. Cell Biol.* 2016. V. 214. № 2. P. 197–213.
<https://doi.org/10.1083/jcb.201601025>
120. Atienzar-Aroca S., Flores-Bellver M., Serrano-Heras G., Martínez-Gil N., Barcia J.M., Aparicio S., Perez-Cremades D., Garcia-Verdugo J.M., Diaz-Llopis M., Romero F.J., Sancho-Pelluz J. // *J. Cell Mol. Med.* 2016. V. 20. № 8. P. 1457–1466.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.12834>
121. Fukuta T., Nishikawa A., Kogure K. // *Biochem. Biophys. Rep.* 2019. V. 21. P. 100713.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2019.100713>
122. Sterzenbach U., Putz U., Low L.H., Silke J., Tan S.S., Howitt J. // *Mol. Ther.* 2017. V. 25. № 6. P. 1269–1278.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.030>
123. Choi S., Yang Z., Wang Q., Qiao Z., Sun M., Wiggins J., Xiang S.H., Lu Q. // *Sci. Adv.* 2023. V. 9. № 4. P. eade2708.
<https://doi.org/10.1126/sciadv.ade2708>
124. Villarroya-Beltri C., Gutiérrez-Vázquez C., Sánchez-Cabo F., Pérez-Hernández D., Vázquez J., Martín-Cofreces N., Martínez-Herrera D.J., Pascual-Montano A., Mittelbrunn M., Sánchez-Madrid F. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 2980.
<https://doi.org/10.1038/ncomms3980>
125. Zubarev I., Vladimirtsev D., Vorontsova M., Blatov I., Shevchenko K., Zvereva S., Lunev E.A., Faizuloev E., Barlev N. // *Cells*. 2021. V. 10. № 11. P. 3043.
<https://doi.org/10.3390/cells10113043>
126. Ginini L., Billan S., Fridman E., Gil Z. // *Cells*. 2022. V. 11. № 9. P. 1375.
<https://doi.org/10.3390/cells11091375>
127. Ohno S., Takanashi M., Sudo K., Ueda S., Ishikawa A., Matsuyama N., Fujita K., Mizutani T., Ohgi T., Ochiya T., Gotoh N., Kuroda M. // *Mol. Ther.* 2013. V. 21. № 1. P. 185–191.
<https://doi.org/10.1038/mt.2012.180>
128. Yin X., Jiang L.H. // *Front. Cardiovasc. Med.* 2023. V. 9. P. 1041481.
<https://doi.org/10.3389/fcvm.2022.1041481>
129. Salomon C., Ryan J., Sobrevia L., Kobayashi M., Ashman K., Mitchell M., Rice G.E. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 7. P. e68451.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068451>
130. Gonzalez-King H., García N.A., Ontoria-Oviedo I., Ciria M., Montero J.A., Sepúlveda P. // *Stem Cells*. 2017. V. 35. № 7. P. 1747–1759.
<https://doi.org/10.1002/stem.2618>
131. Witwer K.W., Van Balkom B.W.M., Bruno S., Choo A., Dominici M., Gimona M., Hill A.F., De Kleijn D., Koh M., Lai R.C., Mütsialis S.A., Ortiz L.A., Rohde E., Asada T., Toh W.S., Weiss D.J., Zheng L., Giebel B., Lim S.K. // *J. Extracell. Vesicles*. 2019. V. 8. № 1. P. 1609206.
<https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1609206>
132. Lai R.C., Tan S.S., Yeo R.W., Choo A.B., Reiner A.T., Su Y., Shen Y., Fu Z., Alexander L., Sze S.K., Lim S.K. // *J. Extracell. Vesicles*. 2016. V. 5. P. 29828.
<https://doi.org/10.3402/jev.v5.29828>
133. Dzhuari S., Basalova N., Primak A., Balabanyan V., Efimenko A., Skryabina M., Popov V., Velichko A., Bozov K., Akopyan Z., Malkov P., Stambolsky D., Tkachuk V., Karagyaour M. // *Pharmaceutics*. 2023. V. 15. № 6. P. 1608.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15061608>
134. Théry C., Kenneth W., Witwer K.W., Aikawa E. et al. // *Journal of Extracellular Vesicles*. 2018. V. 7. P. 1535750.
<https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>

State-of-the-Art: the Use of Extracellular Vesicles and Preparations Based on Them for Neuroprotection and Stimulation of Brain Tissue Regeneration after Injury

N. A. Basalova^{a, b}, S. S. Dzhauri^b, Yu. A. Yurshev^b, A. L. Primak^b,
A. Yu. Efimenko^{a, b}, V. A. Tkachuk^{a, b}, and M. N. Karagyaour^{a, b}

^a*Institute for Regenerative Medicine, Medical Research and Education Center,
Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

^b*Faculty of Medicine, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia*

Extracellular vesicles are macromolecular complexes produced by virtually all types of eukaryotic and prokaryotic cells. According to modern concepts, they allow cells to exchange information, regulate each other's activity and coordinate their actions during the complex processes of development, maintaining homeostasis, tissue regeneration, etc. Extracellular vesicles have a number of unique properties: the ability to accumulate certain types of proteins and nucleic acids, protect them from degradation and ensure their delivery to target cells, which can be used to create biomimetic approaches to the therapy of a wide range of diseases. The composition of vesicles, the preference for docking with a particular cell type, and ultimately their therapeutic potential are very flexible parameters and are highly dependent on the type and properties of the producer cell culture, as well as cultivation conditions. This review gives an idea of the state and prospects of the therapeutic strategies implied the application of extracellular vesicles for neuroprotection and stimulation of brain tissue regeneration after injury, and also considers existing clinical studies which use extracellular vesicles in the field of neurology and neurosurgery. Particular attention in the review is given to new promising approaches to increasing the production of extracellular vesicles, manipulating their contents, and increasing the efficiency of targeted docking in order to increase their therapeutic activity and specificity.

Keywords: extracellular vesicles, ESCRT, neuroprotection, neuroinflammation, mesenchymal stromal cells, neural stem cells

ПОВЫШЕННЫЙ УРОВЕНЬ МАЛЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БОЛЬНЫХ ДЕПРЕССИЕЙ, ЭПИЛЕПСИЕЙ И ЭПИЛЕПСИЕЙ С ДЕПРЕССИЕЙ

© 2023 г. А. А. Яковлев^{1, 2, *}, Т. А. Дружкова², А. Стефанович³, Ю. В. Моисеева¹,
Н. А. Лазарева¹, М. С. Зинчук², Ф. К. Ридер^{2, 4}, А. Б. Гехт^{2, 4}, Н. В. Гуляева^{1, 2}

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
Москва, Россия

²Научно-практический психоневрологический центр
им. З.П. Соловьева ДЗМ, Москва, Россия

³Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

Поступила в редакцию 31.05.2023 г.

После доработки 01.06.2023 г.

Принята к публикации 02.06.2023 г.

Свойства малых внеклеточных везикул (мВВ) и их состав в настоящее время изучены недостаточно, особенно в контексте психических расстройств. Для выяснения роли мВВ проведен количественный анализ мВВ в крови у больных фокальной эпилепсией, больных фокальной эпилепсией с депрессией, психогенными неэпилептическими приступами (ПНЭП) с депрессией, чистой депрессией и биполярным аффективным расстройством (БАР) с текущим депрессивным эпизодом (ДЭ). Малые ВВ выделяли из сыворотки с помощью гель-фильтрации или преципитации ПЭГ, и оба метода показали очень похожие результаты. Во фракции мВВ определяли активность лизосомальных ферментов. Кроме того, были выделены и количественно охарактеризованы нейрональные мВВ. Концентрация мВВ в крови у пациентов с депрессией, фокальной эпилепсией или депрессией с фокальной эпилепсией была выше, чем у здоровых добровольцев. Не было обнаружено различий между пациентами и контрольной группой с точки зрения концентрации нейрональных мВВ. Еще одним выводом нашей работы является то, что мВВ в сыворотке больных содержат различные лизосомальные ферменты. Мы предполагаем, что концентрация мВВ в крови у больных с депрессией или эпилепсией выше за счет секреции мВВ иммунными клетками. Обнаружение мВВ в крови пациентов с депрессией и фокальной эпилепсией делает обоснованными будущие попытки использовать мВВ в качестве диагностических инструментов для этих расстройств.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, сыворотка крови, депрессивное расстройство, эпилепсия, динамическое светорассеяние

DOI: 10.31857/S1027813323040246, EDN: OSXXQV

Список использованных сокращений

мВВ – малые внеклеточные везикулы
ПНЭП – психогенные неэпилептические приступы
БАР – биполярное аффективное расстройство
ДЭ – депрессивный эпизод
ПЭГ – полиэтиленгликоль
BMI – индекс массы тела
BDI-II – шкала депрессии Бека

MMSE – краткая шкала оценки психического статуса

ВВЕДЕНИЕ

Термин малые внеклеточные везикулы (мВВ) используется для частиц размером 100–200 нм [1]. Использование этого термина в первую очередь рекомендуется для случаев, когда состав и происхождение частиц неизвестно или плохо охарактеризовано. К мВВ относятся экзосомы и эктосомы (также известные как микровезикулы) [1], причем экзосомы – фракция частиц эндосомального

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

происхождения — изучены лучше, тогда как об эктосомах данных сравнительно мало.

В настоящее время сигнализация с участием мВВ (в первую очередь экзосом) изучается очень активно [2]. Особое внимание уделяется передаче сигналов с помощью мВВ в головном мозге и изучению роли мВВ в развитии неврологических расстройств. мВВ головного мозга способны проникать через гематоэнцефалический барьер в кровь и, следовательно, могут служить доступным источником информации о состоянии головного мозга при различных патологиях [3]. Роль мВВ в течении неврологических заболеваний показана при болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и боковом амиотрофическом склерозе [4–7]. Нами ранее было показано, что концентрация мВВ в крови увеличивается при наличии у больного депрессивного расстройства [8]. Увеличение концентрации мВВ было продемонстрировано четырьмя независимыми методами: анализом траекторий наночастиц, динамическим светорассеянием, содержанием белка в экзосомальной фракции и иммуноферментным анализом. Результаты, полученные этими методами, сильно коррелировали друг с другом. В той же работе было показано, что динамическое рассеяние света является наиболее простым и удобным для пользователя методом грубой оценки концентрации частиц размером около 100 нм [8].

В следующем эксперименте мы попытались уточнить тип депрессии, характеризующийся повышенным уровнем мВВ в сыворотке крови. Другая цель заключалась в выделении и количественной оценке мВВ нейронального происхождения из крови пациентов. В нашем случае наиболее подходящим методом выделения мВВ из сыворотки оказалась гель-фильтрация, так как этот метод обеспечивает наименьший уровень сывороточных белков во фракции мВВ [9]. Однако в некоторых экспериментальных ситуациях требуются другие методы выделения мВВ из крови. В частности, для выделения фракции нейрональных экзосом необходимо выделение суммарной фракции частиц из крови с использованием высокомолекулярных полиэтиленгликолей (ПЭГ) [6]. Таким образом, в ряде экспериментов необходимо использовать два метода выделения мВВ: преципитацию с помощью ПЭГ и гель-фильтрацию. В то же время остается неизвестным, насколько хорошо коррелируют результаты, полученные этими методами, поэтому мы исследовали корреляцию между этими методами на большом количестве образцов.

мВВ содержат много белков, но функциональное значение большинства секретируемых везикулярных белков неизвестно. В настоящее время получены примеры функционально секретируемых ферментов для нескольких протеаз семейства ме-

таллопротеиназ [10]. Например, в микроокружении опухоли процесс экзосомальной секреции лизосомальных катепсинов является частью опухолевой инвазии [11]. Ранее мы наблюдали секрецию функциональных лизосомальных ферментов [12, 13], но не имеем доказательств конститутивной лизосомальной секреции этих ферментов в составе мВВ. Поэтому еще одной целью нашего исследования была проверка везикулярной локализации секретируемых лизосомальных ферментов.

В настоящей работе мы впервые показали, что сывороточные мВВ содержат лизосомальные ферменты, в том числе функционально активные протеазы. Мы оценили не только функциональное содержание мВВ из сыворотки крови, но и количество мВВ в сыворотке крови больных депрессией или эпилепсией. Наши результаты показали повышенный уровень мВВ в крови у всех пациентов с депрессией, эпилепсией и депрессией с эпилепсией. При этом концентрация нейрональных мВВ не отличалась от контроля. Таким образом, мы делаем вывод, что повышенный уровень циркулирующих мВВ в крови больных с психическими и неврологическими расстройствами не связан с секрецией мВВ головным мозгом. Одно из возможных объяснений наших результатов состоит в том, что дополнительные мВВ в крови пациентов с этими патологиями секретируются иммунными клетками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В исследование были включены 20 больных униполярной депрессией (F32.1, F32.2, F33.1, F33.2), 6 больных биполярным аффективным расстройством с ДЭ (F31.3, F31.4), больные фокальной эпилепсией (G40.1, G40.2, G40.9), девять из них без ДЭ и восемь больных с ДЭ (F32.1, F32.2, F33.1, F33.2), пять больных с ПНЭП (F44.5) с ДЭ (F32.1, F32.2, F33.1, F33.2) и 10 участников контрольной группы. Субъекты включались последовательно из пациентов Московского научно-практического центра психоневрологии с 14.01.2019 по 14.07.2019, если они соответствовали критериям включения. Отдельная группа пациентов, сопоставимая с ранее включенными пациентами, была включена в исследование для определения содержания липидов с 16.09.2019 по 31.12.2019. Критериями включения пациентов были: наличие текущего ДЭ по диагностическим критериям МКБ-10, возраст от 18 до 60 лет. Критериями включения в контрольную группу были: возраст от 18 до 60 лет. Критериями исключения для всех групп были: расстройства шизофренического спектра; история злоупотребления алкоголем и психоактивными веществами; тяжелые неврологические заболевания (инсульт, болезнь Паркинсона, деменция, черепно-мозговые травмы);

дислипидемия; эндокринные нарушения (сахарный диабет, дисфункция щитовидной железы или прием тиреотропных препаратов/заместительная терапия); любые инвалидизирующие заболевания внутренних органов; серьезный дефицит зрения или слуха; значительные физические нагрузки перед обследованием, круглосуточные смены, прием антикоагулянтов и психотропных препаратов в период до госпитализации или до участия в исследовании. Демографическая информация включала возраст, пол, уровень образования, экономический статус. Мы также собирали информацию об индексе массы тела (ИМТ). Исследование было одобрено этическим комитетом, и все участники подписали информированное согласие до начала исследования.

Диагноз фокальной эпилепсии был установлен двумя опытными эпилептологами в соответствии с классификацией Международной противоэпилептической лиги (ILAE) [14]. Пациентов с ПНЭП после видео-ЭЭГ-мониторинга обследовали два опытных эпилептолога и психиатр, специализирующийся на диссоциативных расстройствах. Диагноз депрессивного эпизода был установлен психиатром с помощью M.I.N.I. международного нейропсихиатрического интервью (M.I.N.I. v 7.0.2). Для количественной оценки симптомов депрессии использовали валидированную российскую версию [15] BDI-II [16], которая является “золотым стандартом” для подобных исследований. По этой шкале 0–13 баллов соответствуют минимальной депрессии, 14–19 – легкой депрессии, 20–28 – умеренной депрессии, 29–63 – тяжелой депрессии. Скрининг на биполярное расстройство проводился с помощью валидированной русской версии [17] опросника гипомании – HCL-32 [18] с порогом ≥ 14 , а диагноз подтверждался психиатром с использованием M.I.N.I. Когнитивную функцию оценивали с помощью MMSE [19], а балл 24 и выше считали нормальным. Длительность расстройства также оценивалась для всех пациентов.

Сбор образцов. Материалом для исследования служила сыворотка крови. Забор крови у пациентов и участников контрольной группы осуществлялся путем венопункции утром до еды. Известно, что на формирование мВВ влияет множество факторов [20], поэтому процедура забора крови и преаналитический этап пробоподготовки были максимально стандартизированы. Для всех проб соблюдались одинаковые условия, а именно: время и способ забора крови, тип моноветта и размер иглы (21.5 G); временной интервал (не более 30 мин) и комнатная температура между забором крови и центрифугированием (22°C); условия центрифугирования; условия хранения биологического материала на всех этапах анализа. Пациенты с депрессивным расстройством были про-

анализированы до назначения медикаментозной терапии.

Выделение мВВ из сыворотки с помощью гель-фильтрации. Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования № 40606 ИВНД и НФ РАН “Функциональное картирование мозга”. Перед выделением мВВ образцы сыворотки крови очищали от клеточного дебриса, агрегатов и высокомолекулярных комплексов центрифугированием при 15000 g в течение 30 мин при 4°C. мВВ выделяли из полученной сыворотки с помощью гель-фильтрации. Колонку для гель-фильтрации заполняли 10 мл смолы Sepharose CL-2B (GE Healthcare, США) и уравнивали PBS. На колонку наносили предварительно отцентрифугированную сыворотку крови в объеме 500 мкл, после добавления пробы наносили 2.5 мл PBS, элюат отбрасывали. После этого наносили 1 мл PBS и собирали элюат для дальнейшего анализа. Перед следующей пробой колонку промывали не менее 10 мл PBS [21]. мВВ были заморожены при -80°C .

Выделение мВВ с помощью преципитации ПЭГ 6000. Фракция мВВ была выделена по протоколу, описанному ранее с некоторыми модификациями [22]. Перед выделением мВВ образцы сыворотки крови очищали от клеточного дебриса, агрегатов и высокомолекулярных комплексов центрифугированием при 15000 g в течение 30 мин при 4°C. Полученную сыворотку осаждали ПЭГ 6000. Для этого к 500 мкл сыворотки добавляли 500 мкл 6% ПЭГ 6000 в 45 mM NaCl и смесь инкубировали в течение 30 мин на льду. Затем образцы центрифугировали при 1500 g в течение 30 мин при 4°C. Полученный осадок промывали 100 мкл PBS и растворяли в 500 мкл PBS. Полученную фракцию замораживали при -80°C .

Динамическое рассеяние света. Динамическое светорассеяние фракции мВВ определяли на приборе Zetasizer Nano S производства Malvern Panalytical (Великобритания). В кварцевую кювету заливали 1 мл фракции мВВ, разбавленной в 10 раз в PBS, и определяли светорассеяние под углом 173 градуса на длине волны 633 нм в 10 повторях по 10 с. Прибор позволяет определить количество отраженных фотонов, выраженное в тысячах фотонов в секунду (kcps). Общее количество отраженных фотонов используется для расчета размера частиц, но может служить и независимым параметром, характеризующим образец. Наша предыдущая работа показала, что количество фотонов является надежным показателем, характеризующим концентрацию мВВ в образце [8].

Определение концентрации липидов во фракции мВВ. Концентрацию общих липидов определяли по сульфифосфованилину [23]. Эппендорфы предварительно обрабатывали 70 мкл хлорофор-

ма и инкубировали на шейкере при встряхивании в течение 10 мин при 90°C до испарения хлороформа. В эти пробирки добавляли 50 мкл фракции мВВ в PBS. Затем к пробам добавляли 250 мкл 96% серной кислоты и инкубировали при встряхивании в течение 20 мин при 90°C. После инкубации образцы охлаждали до комнатной температуры и по 220 мкл каждого образца переносили в лунку 96-луночного планшета. В лунки планшета добавляли 110 мкл фосфо-ванилинового реагента (0.2 мг/мл ванилина в 17% фосфорной кислоте) и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, после чего определяли оптическую плотность при 540 нм с помощью планшетного флуориметра HidexSense. (PerkinElmer, Финляндия). В качестве стандарта использовали раствор масла в хлороформе с концентрацией до 2 мкг/мл.

Ультрафильтрация мВВ. Для проведения дот-блоттинга или анализа активности ферментов мы концентрировали частицы с использованием концентраторов Amicon Microcon YM-3. Сначала фракцию (0.5 мл) загружали в емкость для проб и центрифугировали при 13000 g в течение 40 мин при 4°C. Далее концентрированный образец отбирали в новую пробирку при 1000 g в течение 3 мин. Из 900 мкл исходной фракции sEV было получено около 200 мкл концентрата. Полученный концентрат хранили при -80°C.

Определение концентрации белка в мВВ. Концентрацию белка определяли флуоресцентным методом с использованием СВQСА. Реакцию проводили в лунках 96-луночного планшета. К 20 мкл образца добавляли 110 мкл 0.1 М боратного буфера pH 9.3, 5 мкл 20 мМ KCN и 10 мкл рабочего 2 мМ раствора СВQСА. Полученную смесь инкубировали в течение 60 мин в темноте при комнатной температуре, после чего измеряли флуоресценцию при длинах волн возбуждения/испускания 450/550 нм на планшетном флуориметре Hidex Sense (PerkinElmer, Финляндия). В качестве стандарта использовали раствор БСА различной концентрации.

Выделение мВВ нейронального происхождения. Исходным материалом для выделения мВВ нейронального происхождения служила фракция мВВ, выделенная с помощью ПЭГ и концентрированная ультрафильтрацией [24]. Некоторые образцы были потрачены на оптимизацию эксперимента (время инкубации и концентрация антител), поэтому представлены результаты только на основе части исходных образцов. мВВ инкубировали ночь при 4°C в присутствии 4 мкг мышинных антител против белка CD171 человека (L1CAM) (клон 5G3, eBioscience, США) в 3% БСА. Затем добавляли 15 мкл стрептавидин-агарозы (Ultralink, Thermo Scientific, США) в 25 мкл 3% БСА и смесь инкубировали в течение 6 ч при 4°C. Затем смесь

центрифугировали в течение 1 мин при 500 g для осаждения смолы с захваченными на ней нейрональными мВВ. Осадок дважды промывали 500 мкл PBS, а затем ресуспендировали в 200 мкл 0.1 М раствора глицина, pH 2.5, встряхивали в течение 10 мин и центрифугировали в течение 1 мин при 500 g для диссоциации нейрональных мВВ от смолы. Элюаты немедленно нейтрализовали 10 мкл 1 М Трис pH 8.0. Концентрацию мВВ в элюатах оценивали методом динамического светорассеяния.

Дот-блот. Чтобы оценить наличие тетрапептидов в нейрональных мВВ, мы провели дот-блоттинг с использованием антител против CD9 (MA1-80307, Thermo, Великобритания), CD81 (SAB3500454, Sigma, Германия) и CD63 (10628D, Thermo, Норвегия). мВВ наносили на нитроцеллюлозную мембрану с помощью аппарата Bio-Dot (BioRad, США). Мембрану высушивали на воздухе и блокировали 2% обезжиренным сухим молоком в TBST в течение 60 минут при комнатной температуре, а затем обрабатывали антителами при комнатной температуре в течение 1 ч. После трехкратной промывки TBST по 10 мин мембрану инкубировали с субстратом в течение 5 мин. Хемилюминесценцию определяли с помощью MicroChemi (DNR Bio Imaging systems ltd, Израиль) и количественно определяли с помощью программного обеспечения GelQuant.

Протеолитическая активность с субстратом омникатепсина. Суммарную протеолитическую активность цистеинзависимых катепсинов определяли в мВВ, выделенных методом гель-фильтрации. Небольшой набор образцов был случайным образом выбран из каждой группы и объединен для проведения пилотного эксперимента. В этом пилотном эксперименте было определено оптимальное время инкубации, поэтому количество представленных образцов немного меньше, чем указано выше. Концентрированные мВВ инкубировали при 37°C в реакционном буфере (100 мМ MES pH 4.5, 10 мМ дитиотреитола, 1 мМ ЭДТА) в двух параллельных образцах с добавлением 50 мкМ флуорогенного субстрата (*N*-бензоксикарбокси-Phe-Arg-7-амино-4-метилкумарин, Z-FR-AMC, субстрат омникатепсина для всех цистеиновых катепсинов). Флуоресценцию измеряли в течение 60 мин на планшетном флуориметре Wallac 3 (PerkinElmer, США) при длинах волн возбуждения и испускания 380 и 440 нм соответственно. Протеазную активность рассчитывали по флуоресценции известных концентраций стандарта AMC и выражали в пмоль/мин/мг белка.

Анализ активности β-гексозаминидазы. Активность β-гексозаминидазы определяли в мВВ, выделенных с помощью гель-фильтрации. Небольшой набор образцов был случайным образом

Таблица 1. Характеристика исследованных групп

Группа	Количество участников, (m/f)	Средний возраст, лет (min–max)	ВМІ, $M \pm SD$	Средняя длительность, лет (min–max)	BDI-II, $M \pm SD$	MMSE, $M \pm SD$
Здоровый контроль	10 (4/6)	28.4 (24–39)	22.3 \pm 2.4			
Униполярная депрессия	20 (3/17)	33.4 (19–59)	23.2 \pm 4.0	6.6 (0.5–20)	33.8 \pm 10.4	28.5 \pm 1.4
Фокальная эпилепсия без депрессии	9 (4/5)	33.7 (20–56)	25.5 \pm 5.8	14.9 (3–36)	5.5 \pm 3.3	27.4 \pm 1.5
Фокальная эпилепсия с ДЭ	8 (2/6)	37.0 (22–52)	23.8 \pm 2.9	11.1 (3–26)	19.9 \pm 6.9	28.0 \pm 1.3
ПНЭП с ДЭ	5 (1/4)	31.2 (18–50)	21.1 \pm 2.2	9.6 (3–32)	34.0 \pm 7.5	29.0 \pm 1.2
БАР с ДЭ	7 (1/6)	27.9 (21–48)	24.2 \pm 9.7	8.3 (2–17)	34.7 \pm 10.5	28.7 \pm 1.8

выбран из каждой группы и объединен для проведения пилотного эксперимента. Оптимальные экспериментальные условия (время инкубации, pH реакции и концентрация субстрата) были определены в этом пилотном эксперименте, поэтому количество представленных образцов немного меньше, чем указано выше. К концентрированным мВВ добавляли три объема 100 мМ цитрата натрия, pH 4.5, содержащего 1 мМ субстрата β -гексозаминидазы 4-метилумбеллиферил *N*-ацетил- β -D-глюкозаминида, и инкубировали при 37°C в течение 60 мин. Реакцию останавливали пятикратным избытком 0.1 М глицина, pH 10.5, и определяли интенсивность флуоресценции при длинах волн возбуждения и испускания 365 и 440 нм соответственно. В качестве стандарта использовали 4-метилумбеллиферон.

Обработка мВВ протеазами. Для проверки локализации лизосомальных ферментов концентрированные мВВ обрабатывали протеиназой К, трипсином или проназой. Протеазы растворяли в 50 мМ Трис, pH 8.0, и смешивали с образцами до конечной концентрации 1 мг/мл. Образцы инкубировали при 37°C в течение 60 мин, после чего реакцию останавливали добавлением ФМСФ до 1 мМ. В полученных образцах определяли активность гексозаминидазы, как описано выше. Кроме того, протеазное расщепление лизосомальных ферментов во фракции sEV проверяли в присутствии 1% SDS.

Статистический анализ. Статистический анализ выполнен в STATISTICA for Windows ver. 12.5 (StatSoft Inc, США) и GraphPad Prism ver. 8 (GraphPad Soft, США). Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$), среднего значения (min–max) или среднего значения (нижний 95% доверительный интервал – верхний 95% доверительный интервал). Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью непараметрического дисперсионного анализа (ANOVA Крускала–Уоллиса). Множественные сравнения

были сделаны с использованием критерия Данна. Для выявления связи между переменными проводили корреляционный анализ с расчетом рангового коэффициента корреляции Спирмена (ρ) и линейный регрессионный анализ, для которого адекватность модели определяли по коэффициенту детерминации (R -квадрат). t -статистика использовалась для проверки того, значимо ли ρ отличается от нуля (встроенный алгоритм в GraphPad Prism). Выбросы определялись в GraphPad Prism с использованием встроенного алгоритма ROUT ($Q = 1\%$). Все обнаруженные выбросы были исключены из анализа. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительная характеристика участников исследования. Все участники всех исследуемых групп были сопоставимы по возрасту и полу. По шкале BDI-II было 8 пациентов с минимальной депрессией, 6 – с легкой депрессией, 11 – с умеренной депрессией и 23 – с тяжелой депрессией. По данным MMSE, все пациенты имели нормальные когнитивные функции. Характеристики групп представлены в табл. 1.

Корреляция количества мВВ, выделенных разными методами. Одной из целей нашего исследования было сравнение двух методов выделения мВВ: с помощью преципитации ПЭГ и с помощью гель-фильтрации. Общее количество образцов для этого эксперимента равно 56. Результаты представлены на рис. 1а. Наилучшая аппроксимация представляет собой прямую, слегка смещенную вверх от оси x (т.е. точка пересечения с осью y составляет около 3500), так что выделенные образцы ПЭГ всегда завышены по сравнению с образцами гель-фильтрации. Коэффициент наклона этой прямой равен 1.7, что больше единицы; это указывает на большее количество мВВ, выделенных с помощью ПЭГ, по сравне-

нию с количеством мВВ, выделенных с помощью гель-фильтрации (рис. 1а). Коэффициент детерминации для этой аппроксимации составил 0.44.

Между результатами этих методов выделения была обнаружена высокодостоверная корреляция $\rho = 0.52$ (95% доверительный интервал 0.28–0.69, $p < 0.001$), что может свидетельствовать о том, что оба метода выделяют сходные по составу фракции мВВ. В другом эксперименте проверяли связь между концентрацией липидов во фракции мВВ и интенсивностью динамического светорассеяния. Общее количество образцов для этого эксперимента составило 72. Результаты показаны на рис. 1б. Лучшим приближением является линейное приближение с нулевой концентрацией sEV, соответствующей нулевой концентрации липидов во фракции sEV (рис. 1б). Коэффициент детерминации для этого приближения составил 0.66.

Кроме того, между количеством частиц и концентрацией липидов в образцах обнаружена высокодостоверная корреляция, $\rho = 0.4$ (95% доверительный интервал 0.75–0.90, $p < 0.0001$), что свидетельствует о том, что все выделенные частицы имеют одинаковое содержание липидов и, вероятно, относятся к сходным по липидному составу видам. Эти эксперименты показывают, что методы ПЭГ и гель-фильтрации дают приемлемо аналогичную оценку количества частиц в образцах (рис. 1а), поэтому в некоторых случаях их можно использовать взаимозаменяемо.

Мы сравнили концентрацию мВВ в сыворотке крови больных с разными диагнозами (униполярная депрессия, фокальная эпилепсия, фокальная эпилепсия с ДЭ, ПНЭП с ДЭ и БАР с ДЭ), выделив мВВ двумя разными методами. Как и ожидалось, результаты оказались очень похожими (рис. 1а). Количество мВВ, выделенных с помощью ПЭГ, показано на рис. 1в, а количество мВВ, выделенных с помощью гель-фильтрации, показано на рис. 1г. И в первом, и во втором случае дисперсионный анализ Крускала–Уоллиса выявил достоверные различия ($H(5, 56) = 16.45$, $p = 0.006$, $H(5, 56) = 16.67$, $p = 0.005$, соответственно).

Оба метода выделения мВВ выявляют значительное повышение концентрации частиц в сыворотке крови больных фокальной эпилепсией по сравнению с контрольной группой (рис. 1в, г). Гель-фильтрация оказалась более чувствительной в выявлении различий между группами (рис. 1г). В сыворотке крови больных депрессией или депрессией с фокальной эпилепсией концентрация частиц была значительно повышена относительно контроля (рис. 1г). Среднее значение и доверительный интервал (нижний 95% ДИ — верхний 95% ДИ) для контрольной группы на рис. 1в составляет 4594 (2801–6387), а для группы с фокаль-

ной эпилепсией — 13902 (9241–18563). На рис. 1г средние значения и доверительные интервалы составляют 1155 (539–1771) для контрольной группы, 2876 (2426–3325) для депрессии без эпилепсии, 4411 (2388–6435) для эпилепсии без депрессии и 3007 (1803–4212) для депрессии с эпилепсией. Так, доверительный интервал для контрольной группы лежит значительно ниже доверительного интервала для группы эпилепсии (рис. 1в и 1г), а также для группы депрессии (рис. 1г). Эти результаты позволяют сделать вывод, что группа депрессии и группа эпилепсии достоверно отличаются от контрольной группы, несмотря на не столь большое количество пациентов в группах.

Таким образом, все данные, представленные на рис. 1, лежат в основе нашего первого важного методологического вывода, заключающегося в том, что оба метода выделения мВВ из сыворотки дают очень близкие результаты. Второй вывод имеет научное значение: у пациентов с ДЭ и фокальной эпилепсией при ДЭ и у пациентов только с фокальной эпилепсией концентрация мВВ в сыворотке значительно повышена (рис. 1г). Это открытие требует более глубокого изучения происхождения и состава мВВ в сыворотке крови.

Мы предположили, что повышение концентрации мВВ в крови больных с психическими и неврологическими расстройствами связано с мВВ нейронального происхождения. Однако оказалось, что концентрация мВВ нейронального происхождения в крови этих больных не отличалась от контрольного уровня. Этот результат подтверждается данными динамического светорассеяния (рис. 2а), а также иммунореактивностью тетраспанинов CD81 (рис. 2б), CD9 (рис. 2в) и CD63 (рис. 2г) во фракции нейрональных мВВ.

Мы измеряли активность лизосомальных ферментов во фракции мВВ. Основываясь на наших предыдущих результатах, мы решили определить активность β -гексозаминидазы и общую протеолитическую активность лизосомальных цистеиновых катепсинов. В этом эксперименте все образцы были сконцентрированы примерно в четыре раза, поскольку активность в неконцентрированных образцах обычно не обнаруживалась (данные не представлены). Активность лизосомальной β -гексозаминидазы при мВВ в сыворотке больных показана на рис. 3а, а суммарных лизосомальных цистеиновых катепсинов — на рис. 3б. Различий между группами не обнаружено. Несмотря на то, что различий обнаружено не было, эти активности обнаруживались во всех образцах с высокой достоверностью. В случае, когда обе активности происходят из одной и той же органеллы, лизосомы, мы ожидаем найти корреляцию между активностью β -гексозаминидазы и цистеиновых катепсинов. Для проверки взаимосвязи между этими действиями был проведен ли-

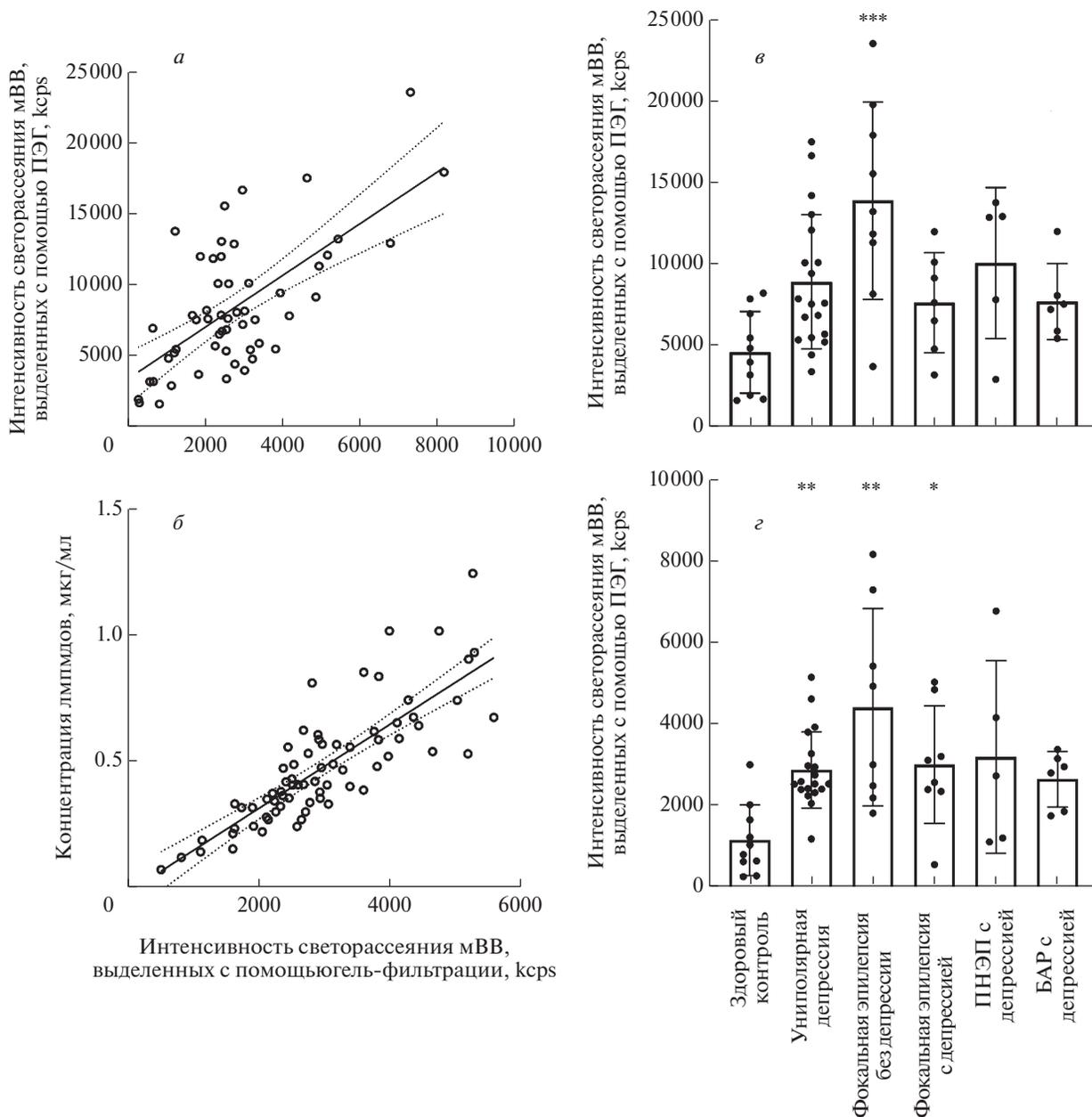


Рис. 1. Два метода выделения мВВ дали схожие результаты. Каждая точка представляет отдельного пациента. (а) Корреляция между концентрацией частиц в образцах, выделенных ПЭГ, и образцах, выделенных гель-фильтрацией. Коэффициент корреляции $r = 0.52$ (95% доверительный интервал 0.28–0.69, $p < 0.0001$). Сплошная линия представляет наилучшее приближение данных к данным, а пунктирная линия представляет 95% доверительный интервал. Концентрацию частиц, выделенных двумя способами, оценивали по динамическому светорассеянию; (б) Корреляция между концентрацией частиц в образцах, выделенных гель-фильтрацией, и концентрацией липидов в этих образцах. Коэффициент корреляции $r = 0.84$ (95% доверительный интервал 0.75–0.90, $p < 0.0001$). Сплошная линия представляет наилучшее приближение данных к данным, а пунктирная линия представляет 95% доверительный интервал. Концентрацию частиц оценивали по динамическому светорассеянию, а концентрацию липидов – по сульфифосфованилину; (в) Концентрация частиц в сыворотке крови больных с разными диагнозами. Частицы выделяли с помощью ПЭГ, а их концентрацию оценивали по динамическому светорассеянию. Дисперсионный анализ Крускала–Уоллиса ANOVA $H(5, 56) = 16.45$, $p = 0.006$, множественные сравнения контрольной группы между собой проводились по критерию Данна, $***p < 0.001$ с контролем. Размер выборки $n = 10$ для здорового контроля, $n = 19$ для униполярной депрессии, $n = 9$ для фокальной эпилепсии без депрессии, $n = 7$ для фокальной эпилепсии при ДЭ, $n = 5$ для психогенных неэпилептических припадков при ДЭ, $n = 6$ для биполярного аффективного расстройства при ДЭ; (г) Концентрация частиц в сыворотке крови больных с разными диагнозами. Частицы выделяли гель-фильтрацией, концентрацию частиц оценивали по динамическому светорассеянию. Дисперсионный анализ Крускала–Уоллиса ANOVA $H(5, 56) = 16.67$, $p = 0.005$, множественные сравнения с контрольной группой проводились по критерию Данна, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ с контролем. Размер выборки $n = 10$ для здорового контроля, $n = 19$ для униполярной депрессии, $n = 8$ для фокальной эпилепсии без депрессии, $n = 8$ для фокальной эпилепсии при ДЭ, $n = 5$ для психогенных неэпилептических припадков при ДЭ, $n = 6$ для биполярного аффективного расстройства при ДЭ.

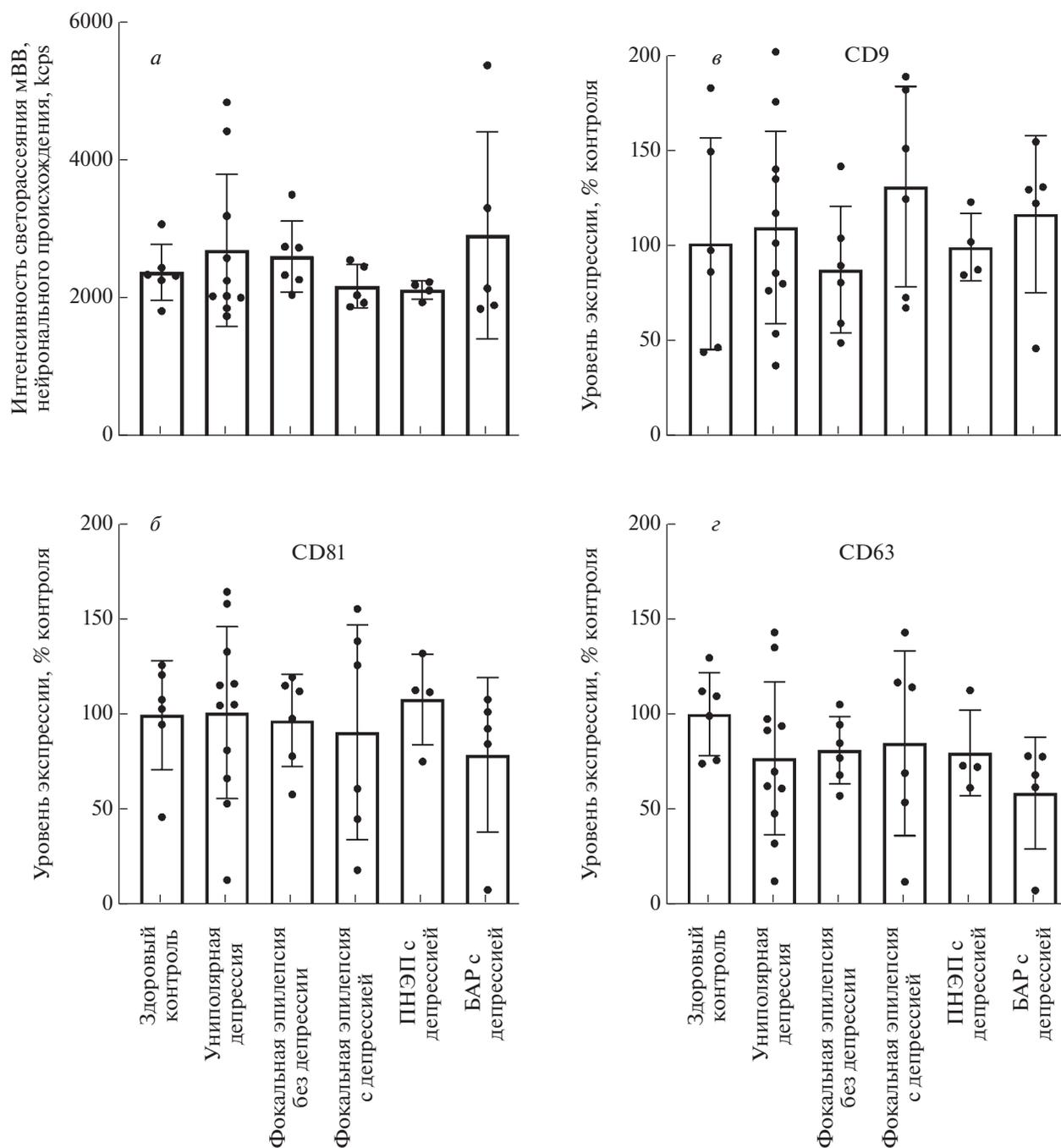


Рис. 2. мВВ нейронального происхождения в сыворотке крови больных с разными диагнозами. (а) Концентрация мВВ нейронального происхождения в сыворотке крови больных с разными диагнозами. мВВ сначала осаждали ПЭГ, а затем иммунопреципитировали антителом L1CAM (CD171). Концентрацию частиц оценивали по динамическому светорассеянию; (б) Иммунореактивность CD81 частиц, несущих L1CAM. Различий между группами выявлено не было; (в) Иммунореактивность CD9 частиц, несущих L1CAM. Различий между группами выявлено не было; (г) CD63-иммунореактивность частиц, несущих L1CAM. Различий между группами выявлено не было. Для всех представленных графиков размер выборки $n = 6$ для здорового контроля, $n = 11$ для униполярной депрессии, $n = 6$ для фокальной эпилепсии без депрессии, $n = 6$ для фокальной эпилепсии в ДЭ, $n = 5$ для ПНЭП с ДЭ, $n = 6$ для БАР с ДЭ.

нейный регрессионный анализ; результаты представлены на рис. 3в. Коэффициент детерминации для этого приближения составил 0.66. Наилучшим приближением является линейное прибли-

жение с нулевой активностью лизосомальных цистеинзависимых протеаз в мВВ, что соответствует активности лизосомальной β -гексозаминазы во фракции мВВ, близкой к нулю (рис. 3в). Меж-

ду этими двумя активностями была обнаружена высокодостоверная корреляция $\rho = 0.89$ (95% доверительный интервал 0.81–0.94, $p < 0.0001$), что указывает на то, что обе активности имеют один и тот же источник, в нашем случае — это лизосомы. Известно, что ферментативная активность, связанная с мВВ, может исходить из сыворотки, а не из содержимого мВВ. Таким образом, остался невыясненным вопрос об источнике активности лизосомальных ферментов. Для его выяснения мы обработали мВВ различными протеазами и обнаружили полностью сохраненную β -гексозаминидазную активность во фракции мВВ (рис. 3г), что указывает на истинную внутривезикулярную локализацию лизосомальных ферментов или на тесную связь лизосомальных ферментов с мВВ, так что они защищены от деградации протеазами белковой короной мВВ.

В этом же эксперименте показано, что инкубация sEVs с протеиназой К в присутствии 1% SDS полностью подавляет активность β -гексозаминидазы (данные не представлены). Активность лизосомальных цистеиновых катепсинов в мВВ после обработки протеазами не определяли, поскольку мы использовали неспецифический субстрат, который может расщепляться и добавленными протеазами, что может приводить к завышению активности катепсинов. Корреляция между активностью различных лизосомальных ферментов в мВВ указывает на то, что лизосомы являются источником некоторых мВВ. Результаты, полученные с β -гексозаминидазой после обработки протеазами, убедительно показали, что мВВ действительно содержат лизосомальные ферменты.

Наши результаты показывают, что концентрация мВВ в сыворотке пациентов с ДЭ, фокальной эпилепсией и ДЭ или только фокальной эпилепсией повышена по сравнению с контрольным уровнем (рис. 1г). Мы предположили, что некоторые симптомы патологии могут быть связаны с повышением уровня мВВ в сыворотке крови. Для выявления возможных ассоциаций мы провели корреляционный анализ между концентрацией мВВ и выраженностью симптомов депрессии (рис. 4а), снижением когнитивных функций (рис. 4б) и длительностью заболевания (рис. 4в). Ни одной корреляции не выявлено. Между концентрацией мВВ и возрастом пациентов выявлена слабая связь (рис. 4г) с коэффициентом корреляции $\rho = 0.32$ (95% доверительный интервал 0.06–0.54, $p < 0.05$) и коэффициентом детерминации 0.08.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В последнее время интерес к мВВ неуклонно растет. Показано, что мВВ участвует в самых разных процессах в организме: от обучения и памяти

[25] до прекондиционирования к летальному повреждению [26, 27]. В онкологии циркулирующие мВВ определяют метастазирование [28], в области цереброваскулярных заболеваний мВВ являются перспективным инструментом для прогнозирования и профилактики заболеваний [29]. Весьма вероятно, что мВВ могут также опосредовать прогрессирование других заболеваний [29, 30]. В связи с этим большое значение имеют исследования роли мВВ при психических расстройствах [31]. Появляются статьи, связывающие мВВ с биполярным расстройством [32, 33], шизофренией [34–36] и депрессией [37–39]. В попытке выявить надежный маркер заболевания мы начали работать с мВВ крови при депрессивном расстройстве [8]. В той своей самой первой работе мы показали, что концентрация мВВ увеличивается в крови больных депрессией [8]. Теперь мы показываем, что это повышение не связано с мВВ нейронального происхождения. Мы предполагаем, что повышенная концентрация мВВ в крови может быть связана с известной активацией иммунной системы при депрессии [38, 40].

Иммунная система может регулировать различные функции организма с помощью мВВ [41]. В самых ранних исследованиях было показано, что экзосомы в крови больных депрессией содержат микроРНК, способные регулировать функцию иммунной системы [42]. В крысиной модели депрессии профиль экзосомальной микроРНК был изменен и, вероятно, может быть ответственным за воспаление [37]. Аналогичные свойства были показаны для эктосом [43]. Эти исследования не касаются содержания белка в мВВ и абсолютного количества мВВ в крови. Мы разделяем основную мысль с авторами цитируемых статей рассматривать мВВ как мессенджеры воспаления в крови. Выяснение содержания мВВ в крови больных депрессией является целью наших будущих исследований. Теперь мы знаем, что мВВ из сыворотки содержат маркеры лизосом, и мы планируем проверить другие маркеры мВВ. Мы предполагаем, что общий высокий уровень мВВ в сыворотке может быть связан с одной фракцией мВВ, или экзосомами, или эктосомами. Выяснение состава этой фракции должно положить начало новому пониманию депрессивного расстройства.

Роль мВВ при эпилепсии в настоящее время неясно. Содержание белков мВВ менялось в модели эпилепсии у мышей и у человека [44], но говорить о диагностической ценности этих находок преждевременно. Одной из возможных ролей мВВ при эпилептических припадках является регуляция воспаления [45]. Таким образом, уровень мВВ может быть повышен при эпилепсии из-за активации иммунной системы и может происходить из иммунных клеток. Если это так, то мы обнаруживаем очень общую черту мВВ при эпилеп-

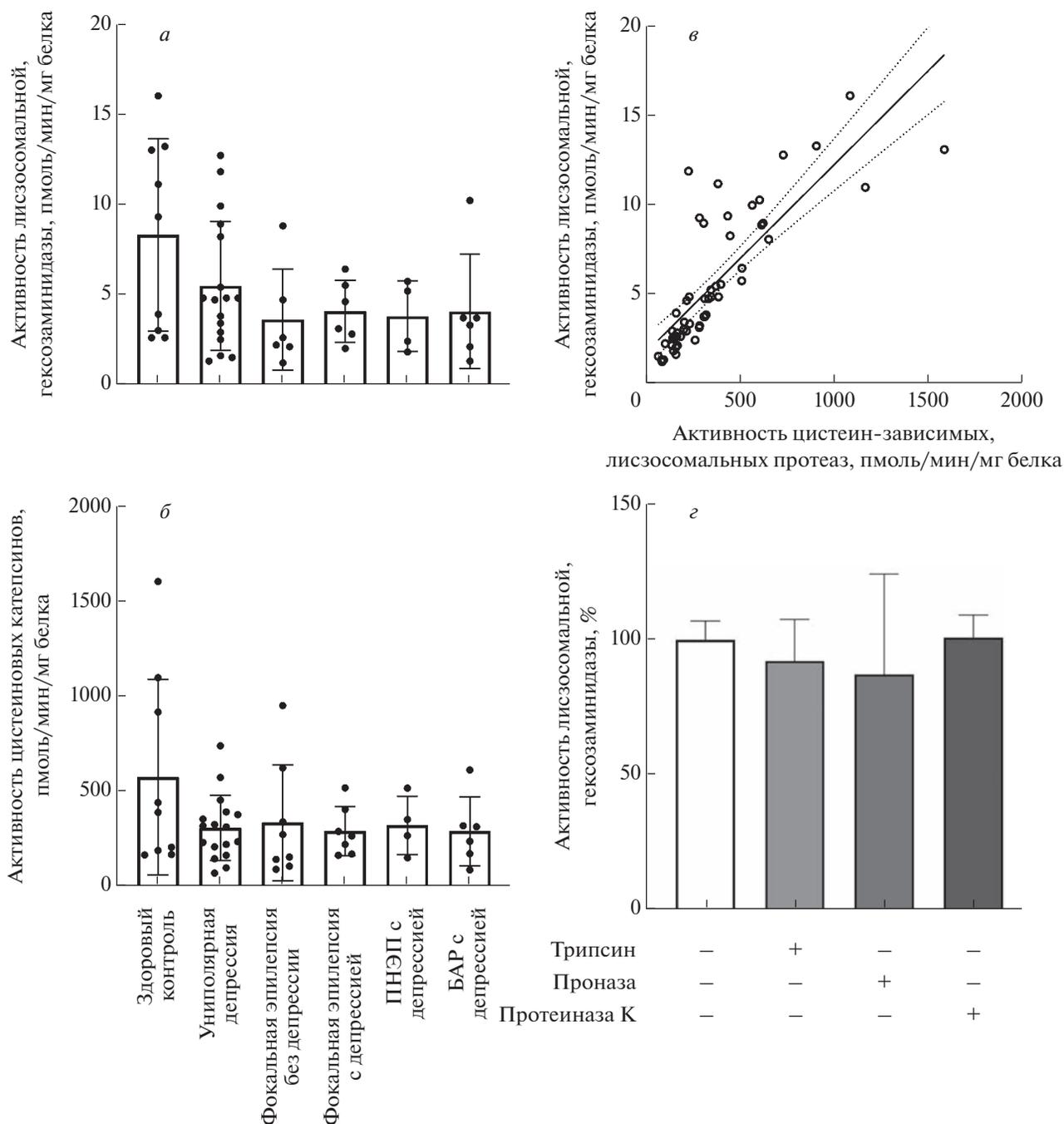


Рис. 3. мВВ в сыворотке содержат лизосомальные ферменты. (а) Активность β -гексозаминидазы в мВВ в сыворотке крови больных с разными диагнозами. Различий между группами выявлено не было. Размер выборки $n = 9$ для здорового контроля, $n = 17$ для униполярной депрессии, $n = 8$ для фокальной эпилепсии без депрессии, $n = 7$ для фокальной эпилепсии с ДЭ, $n = 4$ для ПНЭП с ДЭ, $n = 6$ для БАР с ДЭ; (б) Суммарная активность цистеин-зависимых катепсинов в мВВ в сыворотке крови больных с разными диагнозами. Различий между группами выявлено не было. Размер выборки $n = 9$ для здорового контроля, $n = 17$ для униполярной депрессии, $n = 8$ для фокальной эпилепсии без депрессии, $n = 7$ для фокальной эпилепсии с ДЭ, $n = 4$ для ПНЭП с ДЭ, $n = 6$ для БАР с ДЭ; (в) Корреляция между активностью β -гексозаминидазы и общей активностью цистеинзависимых катепсинов в образцах, выделенных гель-фильтрацией. Коэффициент корреляции $\rho = 0.89$ (95% доверительный интервал 0.81–0.94, $p < 0.0001$). Сплошная линия представляет наилучшее приближение данных к данным, а пунктирная линия представляет 95% доверительный интервал. (г) Активность β -гексозаминидазы в мВВ после обработки мВВ различными протеазами. В отдельном эксперименте обработка мВВ протеазой К в присутствии 1% SDS приводила к полному устранению активности β -гексозаминидазы мВВ (данные не представлены). Общее количество образцов составляет $N = 16$ для эксперимента с протеазами.

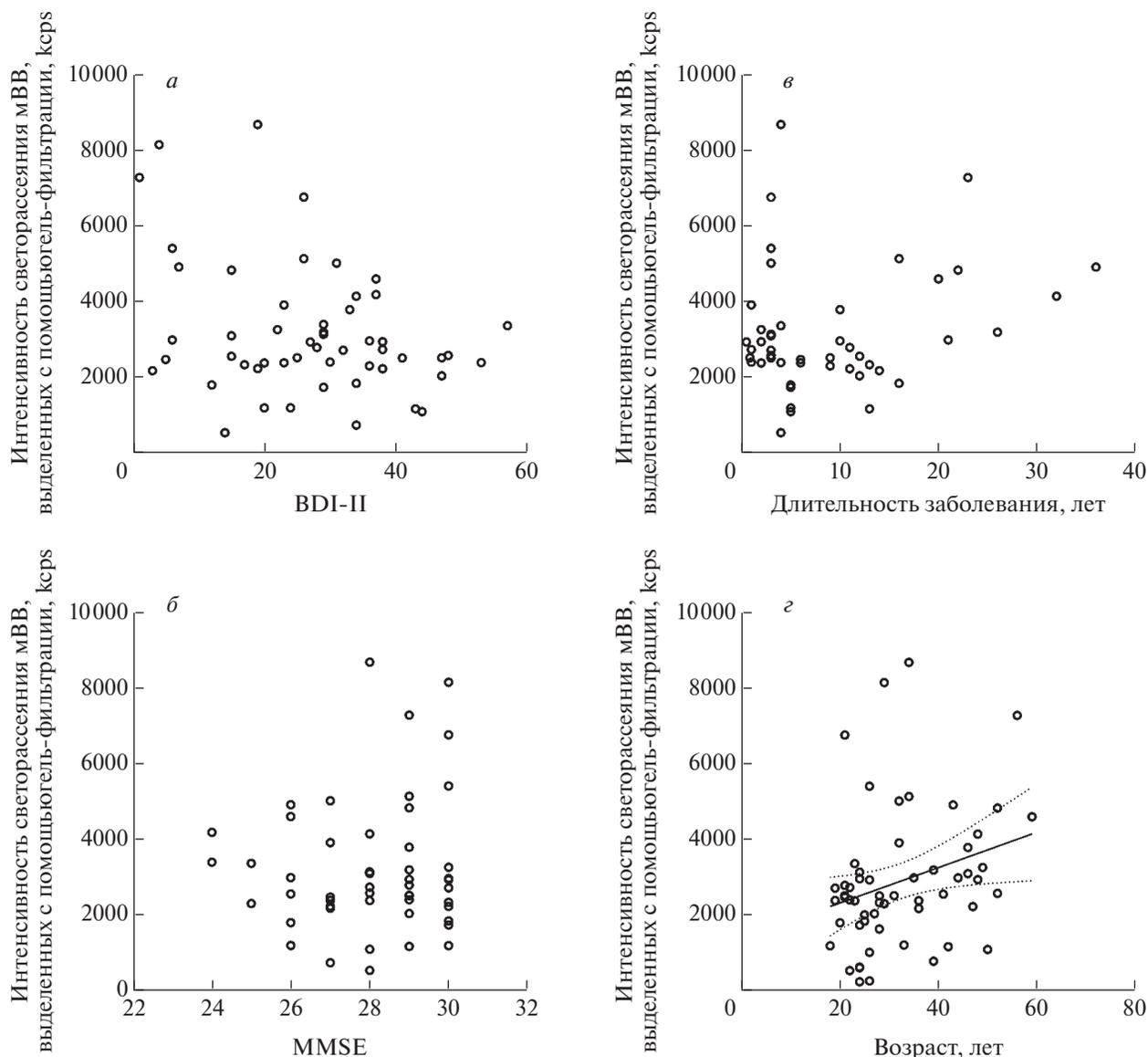


Рис. 4. Зависимость концентрации мВВ в сыворотке от выраженности депрессии, когнитивного статуса, продолжительности заболевания и от возраста. (а) Шкала депрессии Бека; (б) Когнитивные статус по MMSE; (в) Длительность заболевания; (г) Возраст. Коэффициент корреляции $r = 0.32$ (95% доверительный интервал 0.06–0.54, $p < 0.05$). Сплошная линия представляет наилучшее приближение данных к данным, а пунктирная линия представляет 95% доверительный интервал. мВВ выделяли гель-фильтрацией, концентрацию частиц оценивали по динамическому светорассеянию.

сии и депрессии как мессенджеров иммунной системы.

Биогенез экзосом в настоящее время хорошо изучен [2]. Вначале образуется инвагинация плазматической мембраны, заполненная внеклеточным содержимым. Затем везикула открепляется внутри клетки с образованием первичной эндосомы. При созревании эндосомы внутри нее образуются везикулы, заполненные цитоплазматическим содержимым, и первичная эндосома становится мультивезикулярным тельцем. Далее мультивезикулярное тельце может сливаться с

аутофагосомами и/или лизосомами и подвергаться деградации, либо сливаться с плазматической мембраной, высвобождая содержимое наружу в виде экзосом. Процесс секреции может быть как ESCRT-зависимым, так и независимым [46, 47]. Биогенез экзосом также хорошо известен: везикула, наполненная цитоплазматическим содержимым, отпочковывается от плазматической мембраны [46]. Таким образом, ни при каких сценариях мВВ не должны содержать лизосомальные ферменты; тем не менее, мы обнаружили лизосомальные ферменты в мВВ.

Подобные необъяснимые находки уже встречались в литературе. В недавнем исследовании было показано, что некоторые лизосомальные белки синтезируются *de novo* в экзосомы, но авторы не обсуждают возможные механизмы этого явления [48]. Также было показано, что экзосомы нейронального происхождения из крови пациентов с болезнью Альцгеймера и контрольных добровольцев того же возраста содержат лизосомальный катепсин D [24]. Авторы исследования предполагают, что дефекты в эндолизосомной системе приводят к секреции аутолизосомного содержимого в экзосомы, хотя и не обсуждают возможные механизмы [24]. Масс-спектрометрическое исследование выявило относительное содержание лизосомальных ферментов в экзосомах мочи [49], но возможные механизмы не обсуждались. Один установленный механизм секреции лизосомальных ферментов в кровь хорошо известен. Во время активации тромбоциты [50] и тучные клетки [51] секретируют лизосомальные ферменты. Более того, процесс секреции лизосомальных ферментов коррелирует с секрецией мВВ [51]. Тем не менее, в этих ситуациях лизосомальные ферменты секретируются в невезикулярной форме, а секреция растворимых ферментов является хорошо известным следствием секреции лизосом [52, 53]. Процессы секреции лизосом, аутофагосом и экзосом имеют как минимум два общих механизма – снижение активности протеинкиназы PKfyve [54, 55] или повышение активности транскрипционного фактора TFEB [56, 57]. Таким образом, секреция лизосомальных ферментов может происходить одновременно с секрецией экзосом, но не в виде внутрипузырного содержимого.

Лизосомальный экзоцитоз, высвобождение экзосом и секреторная аутофагия очень часто взаимосвязаны [58]. Важным случаем одновременной секреции экзосом и лизосомальных ферментов является процесс лизосомальной секреции в ситуации, когда лизосомы содержат интактные экзосомы [59, 60]. Хотя строгих доказательств получено не было, предполагается, что мультивезикулярные тельца сливаются с лизосомами, но их содержимое не расщепляется лизосомальными ферментами, а секретируется вместе с содержимым лизосом [59, 60]. Аналогичная ситуация возникает, когда клетка секретирует аутофагосомы, которые поглощают патогенные бактерии [61]. Обычно это может произойти только в том случае, если лизосомы клетки не в состоянии справиться с возбудителями внутри клетки. Но во всех этих случаях секретируемые лизосомальные ферменты не находятся внутри секретируемых мВВ, а секретируются вместе с мВВ в растворимой, не связанной с везикулами форме [59–61].

Экзосомальная секреция лизосомальных ферментов была постулирована как часть секретор-

ного фенотипа, связанного со старением [62]. Индуцированное рентгеновским излучением старение фибробластов приводит к секреции лизосомальных ферментов в экзосомах [62]. Возможным недостатком данного исследования является отсутствие обработки экзосом протеазами, что приводит к недоверию к истинной внутрипузырной локализации лизосомальных ферментов. Тем не менее, это исследование дает нам интересную возможность рассматривать активность лизосомальных ферментов во фракции мВВ сыворотки как показатель состояния старения клеток в организме [62].

В наших экспериментах лизосомальные ферменты располагаются внутри мВВ или, тесно связаны с наружной везикулярной мембраной, глубоко погружены в белковую корону мВВ, так как обработка мВВ протеазами не изменяет активность этих ферментов. Секреция лизосомальных ферментов внутри мВВ была показана впервые, поэтому еще не нашла объяснения. Можно предположить некоторые механизмы, которые могут приводить к секреции лизосомальных ферментов внутри мВВ. Широко известно, что лизосомальные ферменты могут быть обнаружены в цитозоле в результате пермеабиллизации лизосомальных мембран [63]. Проницаемость лизосомальной мембраны может быть вызвана активными формами кислорода [64] и лизосомотропными агентами [65]. Катепсины могут быть обнаружены в цитозоле после пермеабиллизации лизосомальной мембраны [66]. Цитозольные ферменты могут секретироваться в просвет экзосом [67]. Вероятно, мы видим эти просочившиеся ферменты в мВВ в сыворотке. В этом случае лизосомальные ферменты в мВВ отражают интенсивность разрыва лизосом в родительской клетке. Целостность лизосомальных мембран сильно нарушена при раке [66], поэтому наша гипотеза предсказывает повышенное содержание лизосомальных ферментов в мВВ из раковых клеток. Другой путь проникновения лизосомального фермента в просвет мВВ лежит через секрецию лизосом. Лизосомы выделяют свое содержимое во многих физиологических и патологических ситуациях [68]. Секретируемые ферменты могут интернализироваться клетками и секвестрироваться в ранних эндосомах, а затем повторно секретироваться в процессе эндоцитарной рециркуляции [69]. В этом случае лизосомальные ферменты в мВВ отражают секреторную активность клеток крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наша работа представляет несколько интересных результатов и предлагает новые направления исследований мВВ. Во-первых, мВВ повышены в сыворотке крови больных эпилепсией, депрессией и эпилепсией с депрессией. Во-вторых, эти

мВВ не нейронального происхождения. Источник дополнительных мВВ неизвестен, но мы связываем его с активацией иммунной системы. В-третьих, мВВ содержат лизосомальные ферменты из неизвестных клеток. Эти выводы требуют глубокого изучения, но ожидаемые результаты могут открыть новые возможности для клиники.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Автономной некоммерческой организацией “Московский центр инновационных технологий в здравоохранении”, грант № 2412-45/22.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны следующим лицам, которые помогали им в выполнении технической работы: Софья Попова, Антон Рагузин, Евгений Пашнин и Надежда Воинова. Авторы также выражают признательность компании КДСО и лично Сергею Васину и Евгению Дуплякину за помощь в разработке протокола динамического светорассеяния для обнаружения мВВ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие известных конфликтов интересов, связанных с этой публикацией, и отсутствие такой финансовой поддержки этой работы, которая могла бы повлиять на ее результаты.

Этическое одобрение. Исследование было одобрено этическим комитетом.

Информированное согласие. Все участники подписали информированное согласие до начала исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thery C., Witwer K.W., Aikawa E., Alcaraz M.J., Anderson J.D., Andriantsitohaina R., Antoniou A., Arab T., Archer F., Atkin-Smith G.K. et al. // *J. Extracell. Vesicles*. 2018. V. 7. № 1. P. 1535750.
2. Kalluri R., LeBleu V.S. // *Science*. 2020. V. 367. № 6478. eaau6977.
3. Druzhkova T.A., Yakovlev A.A. // *Neurochem. J.* 2018. V. 12. № 3. P. 195–204.
4. Ardashirova N.S., Fedotova E.Y., Illarionov S.N. // *Neurochem. J.* 2020. V. 14. № 2. P. 127–132.
5. Ivanova M.V., Chekanova E.O., Belugin B.V., Tutykhina I.L., Dolzhenkova I.V., Zakroishchikova I.V., Vasil'ev A.V., Zakharova M.N. // *Neurochem. J.* 2019. V. 13. № 3. P. 229–239.
6. Kapogiannis D., Mustapic M., Shardell M.D., Berkowitz S.T., Diehl T.C., Spangler R.D., Tran J., Lazaropoulos M.P., Chawla S., Gulyani S., Eitan E., An Y., Huang C.W., Oh E.S., Lyketsos C.G., Resnick S.M., Goetzl E.J., Ferrucci L. // *JAMA Neurol.* 2019. V. 76. № 11. P. 1340–1351.
7. Chung C.-C., Chan L., Chen J.-H., Bamodu O.A., Chiu H.-W., Hong C.-T. // *FASEB J.* 2021. V. 35. № 10. e21895.
8. Yakovlev A.A., Druzhkova T.A., Nikolaev R.V., Kuznetsova V.E., Gruzdev S.K., Guekht A.B., Gulyaeva N.V. // *Neurochem. J.* 2019. V. 13. № 4. P. 385–390.
9. Buschmann D., Kirchner B., Hermann S., Marte M., Wurmser C., Brandes F., Kotschote S., Bonin M., Steinlein O.K., Pfaffl M.W., Schelling G., Reithmair M. // *J. Extracell. Vesicles*. 2018. V. 7. № 1. P. 1481321.
10. Quesnel A., Broughton A., Karagiannis G.S., Filippou P.S. // *Cancer Metastasis Rev.* 2022. V. 41. № 4. 789–801.
11. Raimondi L., De Luca A., Amodio N., Manno M., Racosta S., Taverna S., Bellavia D., Naselli F., Fontana S., Schillaci O., Giardino R., Fini M., Tassone P., Santoro A., De Leo G., Giavaresi G., Alessandro R. // *Oncotarget*. 2015. V. 6. № 15. P. 13772–13789.
12. Onufriev M.V., Yakovlev A.A., Lyzhin A.A., Stepanichev M.Y., Khaspekov L.G., Gulyaeva N.V. // *Biochem.* 2009. V. 74. № 3. P. 281–287.
13. Yakovlev A.A., Kvichansky A.A., Lyzhin A.A., Khaspekov L.G., Gulyaeva N.V. // *Neurochem. J.* 2013. V. 7. № 2. P. 111–120.
14. Scheffer I.E., Berkovic S., Capovilla G., Connolly M.B., French J., Guilhoto L., Hirsch E., Jain S., Mathern G.W., Moshe S.L., Nordli D.R., Perucca E., Tomson T., Wiebe S., Zhang Y.H., Zuberi S.M. // *Epilepsia*. 2017. V. 58. № 4. P. 512–521.
15. Zlobina M.V., Pervushina O.N. // *Reflexio*. 2018. V. 11. P. 83–98.
16. Beck A.T., Steer R.A., Ball R., Ranieri W.F. // *J. Pers. Assess.* 1996. V. 67. № 3. P. 588–597.
17. Mosolov S.N., Ushkalova A.V., Kostukova E.G., Shafarenko A.A., Alfimov P.V., Kostyukova A.B., Angst J. // *J. Affect. Disord.* 2014. V. 155. P. 90–95.
18. Angst J., Adolfsson R., Benazzi F., Gamma A., Hantouche E., Meyer T.D., Skeppar P., Vieta E., Scott J. // *J. Affect. Disord.* 2005. V. 88. № 2. P. 217–233.
19. Folstein M.F., Folstein S.E., McHugh P.R. // *J. Psychiatr. Res.* 1975. V. 12. № 3. P. 189–198.
20. Witwer K.W., Buzás E.I., Bemis L.T., Bora A., Lässer C., Lötvall J., Nolte-’t Hoen E.N., Piper M.G., Sivaraman S., Skog J., Théry C., Wauben M.H., Hochberg F. // *J. Extracell. Vesicles*. 2013. V. 2. № 1. P. 20360.
21. Gamez-Valero A., Monguio-Tortajada M., Carreras-Planella L., Marcel-la F., Beyer K., Borrás F.E. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 33641.
22. Rider M.A., Hurwitz S.N., Meckes D.G. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 23978.
23. Osteikoetxea X., Balogh A., Szabo-Taylor K., Nemeth A., Szabo T.G., Paloczi K., Sodar B., Kittel A., Gyorgy B., Pallinger E., Matko J., Buzas E.I. // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 3. e0121184.
24. Goetzl E.J., Boxer A., Schwartz J.B., Abner E.L., Petersen R.C., Miller B.L., Kapogiannis D. // *Neurology*. 2015. V. 85. № 1. P. 40–47.
25. Schiera G., Di Liegro C.M., Di Liegro I. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 21. № 1. P. 266.
26. Yakovlev A.A., Lyzhin A.A., Aleksandrova O.P., Khaspekov L.G., Gulyaeva N.V. // *Biochem. Suppl. Ser. B Biomed. Chem.* 2020. V. 14. № 1. P. 1–5.

27. Giricz Z., Varga Z.V., Baranyai T., Sipos P., Paloczki K., Kittel A., Buzas E.I., Ferdinandy P. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2014. V. 68. P. 75–78.
28. Hoshino A., Costa-Silva B., Shen T.L., Rodrigues G., Hashimoto A., Tesic Mark M., Molina H., Kohsaka S., Di Giannatale A., Ceder S., Singh S., Williams C., Sopplop N., Uryu K., Pharmed L., King T., Bojmar L., Davies A.E., Ararso Y., Zhang T., Zhang H., Hernandez J., Weiss J.M., Dumont-Cole V.D., Kramer K., Wexler L.H., Narendran A., Schwartz G.K., Healey J.H., Sandstrom P., Jørgen Labori K., Kure E.H., Grandgenett P.M., Hollingsworth M.A., De Sousa M., Kaur S., Jain M., Mallya K., Batra S.K., Jarnagin W.R., Brady M.S., Fodstad O., Muller V., Pantel K., Minn A.J., Bissell M.J., Garcia B.A., Kang Y., Rajasekhar V.K., Ghajar C.M., Matei I., Peinado H., Bromberg J., Lyden D. // *Nature*. 2015. V. 527. № 7578. P. 329–335.
29. Gomez-Molina C., Sandoval M., Henzi R., Ramirez J.P., Varas-Godoy M., Luarte A., Lafourcade C.A., Lopez-Verrilli A., Smalla K.H., Kaehne T., Wyncken U. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2019. V. 22. № 3. P. 232–246.
30. Gulyaeva N.V. // *Biochemistry-Moscow*. 2019. V. 84. № 11. P. 1306–1328.
31. Saeedi S., Israel S., Nagy C., Turecki G. // *Transl. Psychiatry*. 2019. V. 9. № 1. P. 122.
32. Ceylan D., Tufekci K.U., Keskinoglu P., Genc S., Özerdem A. // *J. Affect. Disord.* 2020. V. 262. P. 99–107.
33. Fries G.R., Lima C.N.C., Valvassori S.S., Zunta-Soares G., Soares J.C., Quevedo J. // *J. Affect. Disord.* 2019. V. 255. P. 10–14.
34. Kapogiannis D., Dobrowolny H., Tran J., Mustapic M., Frodl T., Meyer-Lotz G., Schiltz K., Schanze D., Riet-schel M., Bernstein H.G., Steiner J. // *Eur. Psychiatry*. 2019. V. 62. P. 124–129.
35. Amoah S.K., Rodriguez B.A., Logothetis C.N., Chander P., Sellgren C.M., Weick J.P., Sheridan S.D., Jantzie L.L., Webster M.J., Mellios N. // *Neuropsychopharmacology*. 2020. V. 45. № 4. P. 656–665.
36. Goetzl E.J., Srihari V.H., Guloksuz S., Ferrara M., Tek C., Heninger G.R. // *FASEB J.* 2021. V. 35. № 2. e21339.
37. Ke F., Xu J.X., Chen X.X., Gao X.R., Huang L.L., Du A.Q., Jiang C., Ge J.F. // *J. Affect. Disord.* 2020. V. 274. P. 144–158.
38. Kuwano N., Kato T.A., Mitsuhashi M., Sato-Kasai M., Shimokawa N., Hayakawa K., Ohgidani M., Sagata N., Kubo H., Sakurai T., Kanba S. // *J. Affect. Disord.* 2018. V. 240. P. 88–98.
39. Nasca C., Dobbin J., Bigio B., Watson K., de Angelis P., Kautz M., Cochran A., Mathe A.A., Kocsis J.H., Lee F.S., Murrough J.W., McEwen B.S., Rasgon N. // *Mol. Psychiatry*. 2021. V. 26. № 9. P. 5140–5149.
40. Fruhbeis C., Frohlich D., Kuo W.P., Kramer-Albers E.M. // *Front. Cell. Neurosci.* 2013. V. 7. P. 182.
41. Brites D., Fernandes A. // *Front. Cell. Neurosci.* 2015. V. 9. P. 476.
42. Zhang Y., Zhao Y., Tian C., Wang J., Li W., Zhong C. // *Eur. J. Psychiatry*. 2018. V. 32. № 3. P. 105–112.
43. Hulsmans M., Holvoet P. // *Cardiovasc. Res.* 2013. V. 100. № 1. P. 7–18.
44. Lin Z.J., Gu Y.X., Zhou R.J., Wang M.L., Guo Y., Chen Y.Y., Ma J.H., Xiao F., Wang X.F., Tian X. // *Front. Neurosci.* 2020. V. 14. P. 737.
45. Gao X.Y., Mian G., Liu J., Zhu Y.M., Cui Y., Shu S.J., Gou H.Y., Sun F.X., Qi S.H., Sun J.H. // *J. Cell. Mol. Med.* 2020. V. 24. № 22. P. 12980–12993.
46. van Niel G., D'Angelo G., Raposo G. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. V. 19. № 4. P. 213–228.
47. Skryabin G.O., Komelkov A.V., Savelyeva E.E., Tchekvina E.M. // *Biochem.* 2020. V. 85. № 2. P. 177–191.
48. Tan C.F., Teo H.S., Park J.E., Dutta B., Tse S.W., Leow M.K.S., Wahli W., Sze S.K. // *Cells*. 2020. V. 9. № 5. P. 1320.
49. Bijnisdorp I.V., Maxouri O., Kardar A., Schelfhorst T., Piersma S.R., Pham T.V., Vis A., van Moorselaar R.J., Jimenez C.R. // *J. Extracell. Vesicles*. 2017. V. 6. P. 1313091.
50. Ciferri S., Emiliani C., Guglielmini G., Orlacchio A., Nenci G.G., Gresele P. // *Thromb. Haemost.* 2000. V. 83. № 1. P. 157–164.
51. Kormelink T.G., Arkesteijn G.J.A., van de Lest C.H.A., Geerts W.J.C., Goerdayal S.S., Altelaar M.A.F., Redegeld F.A., Nolte-'t Hoen E.N.M., Wauben M.H.M. // *J. Immunol.* 2016. V. 197. № 8. P. 3382–3392.
52. Yakovlev A.A., Gulyaeva N.V. // *Biochem.* 2015. V. 80. № 2. P. 163–171.
53. Jaiswal J.K., Andrews N.W., Simon S.M. // *J. Cell Biol.* 2002. V. 159. № 4. P. 625–635.
54. Min S.H., Suzuki A., Stalker T.J., Zhao L., Wang Y.H., McKennan C., Riese M.J., Guzman J.F., Zhang S.H., Lian L.R., Joshi R., Meng R.H., Seeholzer S.H., Choi J.K., Koretzky G., Marks M.S., Abrams C.S. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 4691.
55. Hessvik N.P., Verbye A., Brech A., Torgersen M.L., Jakobsen I.S., Sandvig K., Llorente A. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2016. V. 73. № 24. P. 4717–4737.
56. Yang Y., Qin M.L., Bao P.H., Xu W.C., Xu J. // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 7. e0180892.
57. Medina D.L., Fraldi A., Bouche V., Annunziata F., Mansueto G., Spanpanato C., Puri C., Pignata A., Martina J.A., Sardiello M., Palmieri M., Polishchuk R., Puertollano R., Ballabio A. // *Dev. Cell*. 2011. V. 21. № 3. P. 421–430.
58. Buratta S., Tancini B., Sagini K., Delo F., Chiaradia E., Urbanelli L., Emiliani C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 7. P. 2576.
59. Machado E., White-Gilbertson S., van de Vlekkert D., Janke L., Moshiaich S., Campos Y., Finkelstein D., Gomero E., Mosca R., Qiu X.H., Morton C.L., Annunziata I., d'Azzo A. // *Sci. Adv.* 2015. V. 1. № 11. e1500603.
60. Kim M.S., Muallem S., Kim S.H., Kwon K.B. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2019. V. 510. № 3. P. 409–415.
61. Miao Y.X., Li G.J., Zhang X.L., Xu H.X., Abraham S.N. // *Cell*. 2015. V. 161. № 6. P. 1306–1319.
62. Basisty N., Kale A., Jeon O.H., Kuehnemann C., Payne T., Rao C., Holtz A., Shah S., Sharma V., Ferrucci L., Campisi J., Schilling B. // *Plos Biol.* 2020. V. 18. № 1. e3000599.

63. *Yadati T., Houben T., Bitorina A., Shiri-Sverdlov R.* // *Cells*. 2020. V. 9. № 7. P. 1679.
64. *Hoppe G., O'Neil J., Hoff H.F., Sears J.* // *Biochim. Biophys. Acta-Molecular Basis Dis.* 2004. V. 1689. № 1. P. 33–41.
65. *Deng D., Jiang N., Hao S.J., Sun H., Zhang G.J.* // *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes*. 2009. V. 1788. № 2. P. 470–476.
66. *Boya P., Kroemer G.* // *Oncogene*. 2008. V. 27. № 50. P. 6434–6451.
67. *Raposo G., Stoorvogel W.* // *J. Cell Biol.* 2013. V. 200. № 4. P. 373–383.
68. *Settembre C., Fraldi A., Medina D.L., Ballabio A.* // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013. V. 14. № 5. P. 283–296.
69. *Maxfield F.R., McGraw T.E.* // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004. V. 5. № 2. P. 121–132.

Elevated Level of Small Extracellular Vesicles in the Serum of Patients with Depression, Epilepsy and Epilepsy with Depression

A. A. Yakovlev^{a, b}, T. A. Druzhkova^b, A. Stefanovich^c, Yu. V. Moiseeva^a, N. A. Lazareva^a, M. S. Zinchuk^b, F. K. Rider^{b, d}, A. B. Guekht^{b, d}, and N. V. Gulyaeva^{a, b}

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

^b*Moscow Research and Clinical Center for Neuropsychiatry, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia*

^c*First Moscow State Medical University named after I.M. Sechenov, Moscow, Russia*

^d*Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia*

Small extracellular vesicles (sEVs) properties and sEVs composition are far from being well-studied for now, especially in the context of mental disorders. To elucidate the role of sEVs in disease we performed a quantitative analysis of the blood sEV in patients with focal epilepsy and patients with focal epilepsy with depression, psychogenic non-epileptic seizures with depression, pure depression, and bipolar affective disorder with the current depressive episode (cDE). Small EVs were isolated from the serum by gel filtration or PEG precipitation, and both methods showed very similar results. Subsequently, we precipitated neuronal sEVs and quantified it with several methods. Activity of lysosomal enzymes was determined in the sEVs fraction. The concentration of the blood sEVs in patients with depression, focal epilepsy, or depression with focal epilepsy was higher than in healthy controls. No difference was found between patients and controls in terms of neuronal sEVs concentration. Another finding of our work is that sEVs in the serum of patients contains various lysosomal enzymes. We suppose that the concentration of the blood sEVs in patients with depression or epilepsy is higher due to the sEVs secretion by the immune cells. Finding sEVs in the blood of patients with depression and focal epilepsy grants validity for future attempts to use sEVs as diagnostic tools for these disorders.

Keywords: extracellular vesicles, blood serum, depressive disorder, epilepsy, dynamic light scattering

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МАЛЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ВЕЗИКУЛ ИЗ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ С НЕСУИЦИДАЛЬНЫМ САМОПОВРЕЖДЕНИЕМ

© 2023 г. И. Н. Мишин¹ *, М. С. Зинчук¹, Т. А. Дружкова¹,
Н. В. Гуляева^{1,2}, А. Б. Гехт^{1,3}, А. А. Яковлев^{1,2}

¹ГБУЗ “Научно-практический психоневрологический центр
им. З.П. Соловьева” Департамента здравоохранения Москвы, Москва, Россия

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

³ФГАОУ ВО “Российский национальный исследовательский медицинский университет
им. Н.И. Пирогова”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 02.06.2023 г.

После доработки 03.06.2023 г.

Принята к публикации 04.06.2023 г.

Цель исследования — определение количественных характеристик малых внеклеточных везикул (мВВ) в крови пациентов с несуйцидальным самоповреждением (НССП) и сравнение концентрации и размеров мВВ у пациентов с большим депрессивным расстройством (БДР) с НССП и без такового, а также оценка связи размеров и концентрации мВВ в выборке с такими параметрами как выраженность ситуативной и личностной тревоги, депрессии и суицидального риска. В исследовании были включены 28 пациентов (11 м./17 ж.) с текущим эпизодом большой депрессии и как минимум пятью эпизодами НССП за последние 12 мес. (основная группа, средний возраст 28.3 года) и 28 пациентов с большой депрессией идентичных по полу и возрасту без НССП на протяжении жизни (группа сравнения). Оценка психического состояния пациентов проводилась с помощью интервью MINI, опросника депрессии Бека — II (BDI II) и шкалы тревоги Спилбергера. Выделение мВВ из крови проводилось с помощью преципитации полиэтиленгликолем (ПЭГ) и гель-фильтрации. Размер и концентрацию выделенных частиц оценивали с помощью динамического светорассеяния (ДРС) и анализа траекторий наночастиц (АТН). Группы значительно различались по выраженности депрессии по опроснику BDI-II, шкале ситуационной тревоги Спилбергера и шкале личностной тревоги Спилбергера. Оценка суицидального риска, проведенная по соответствующему модулю опросника MINI, выявила в группе пациентов с НССП значимо большее число участники со средним и высоким суицидальным риском. Из крови пациентов основной группы и группы сравнения была выделена фракция мВВ. Не было выявлено различий в концентрации и размерах мВВ между группами пациентов с депрессией с и без НССП. Также нам не удалось выявить зависимости концентрации и размеров мВВ от выраженности депрессии, ситуативной и личностной тревоги и тяжести суицидального риска. Заключение: НССП у лиц с большим депрессивным расстройством связано с более тяжелым течением расстройства (большая выраженность депрессии, ситуативной и личностной тревоги), а также более высоким суицидальным риском. Наше исследование не выявило отличий количественных характеристик мВВ у пациентов с депрессивным эпизодом с и без НССП. Будущие исследования должны быть направлены на исследование структурных отличий и функциональных особенностей мВВ при НССП.

Ключевые слова: несуйцидальное самоповреждающее поведение, депрессия, суицидальность, малые внеклеточные везикулы, динамическое светорассеяние, анализ траекторий наночастиц

DOI: 10.31857/S1027813323040180, EDN: OTSQGM

Список сокращений

НССП — несуйцидальное самоповреждающее поведение

ВВ — внеклеточные везикулы

мВВ — малые внеклеточные везикулы

ДРС — динамическое светорассеяние

АТН — анализ траектории наночастиц

ПЭГ — полиэтиленгликоль

БДР — большое депрессивное расстройство

ПРЛ — пограничное расстройство личности

ИФА — иммуноферментный анализ

* Адресат для корреспонденции: 115419, Москва, ул. Донская, д. 43, e-mail: docmishin@vk.com.

ВВЕДЕНИЕ

Самоубийство является одной из ведущих предотвратимых причин преждевременной смерти. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) в год около 0.7 млн человек умирает в результате самоубийства, при этом число совершающих суицидальную попытку намного больше [1]. В отличие от многих других ведущих причин смерти, таких как онкологические и кардиологические заболевания, показавших постепенное снижение уровня смертности за последние десятилетия [2, 3], уровень самоубийств среди молодых людей за предшествующие 45 лет вырос в мире на 60% [4].

Предотвращение суицидального поведения затруднено отсутствием надежных предикторов, в особенности среди лиц из групп высокого риска совершения попытки. Суицидальное поведение имеет сложный генез, определяющийся взаимодействием разнородных переменных, включающих, среди прочих социально-демографические факторы [5], факторы окружающей среды, психологические [6–8] и биологические факторы [9], в том числе генетические переменные [10]. Ряд клинических факторов, таких как наличие болевого синдрома, нарушений сна, некоторые неврологические и многие психические расстройства связаны с повышенным суицидальным риском [11–15]. В то же время даже среди лиц с расстройствами настроения, представляющих собой группу особо высокого риска развития суицидального поведения [16, 17], лишь малая часть совершает суицидальную попытку. По данным Nock et al. (2013) только около трети подростков с суицидальными мыслями совершали суицидальную попытку в течение жизни [18]. В связи с этим особое значение приобретает исследование механизмов, участвующих в переходе от суицидальной идеи к суицидальной попытке в группах высокого риска [19].

К числу наиболее значимых клинических факторов риска совершения суицидальной попытки относится НССП, которое определяется как социально несанкционированное прямое повреждение тканей тела без суицидальных намерений [20]. Данный феномен широко распространен как в клинических выборках, так и в общей популяции. По данным ряда исследований, в последние десятилетия в мире происходит рост числа лиц, практикующих НССП [21]. Griep et al. (2022) выявили, что опыт НССП является предиктором совершения в будущем суицидальной попытки. Особенно этот эффект прослеживается у женщин и лиц с диагнозом пограничного расстройства личности (ПРЛ), расстройств настроения или представленностью в клинической картине симптомов депрессии [22]. Одним из механизмов, облегчающих переход от суицидальной идеи к совер-

шению суицидальной попытки, лицами с опытом НССП, является формирующаяся в результате систематических самоповреждений “привычность” переживания боли и вида крови [23, 24]. В то же время постепенно накапливаются данные, свидетельствующие о вовлеченности генетических [25, 26] и эпигенетических [27] механизмов, а также изменении в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси [28], автономной нервной системе [29] и системе восприятия боли [30]. Однако, до настоящего времени, сохраняются пробелы в понимании биологических механизмов развития самоповреждающего поведения, а также противоречия в результатах исследований некоторых биологических коррелятов НССП [31]. Последние отчасти могут быть связаны с недостатками дизайна исследований и относительно малым количеством участников, что требует их проверки новыми экспериментами [31, 32].

Новым направлением в изучении этиопатогенеза психических расстройств стали исследования внеклеточных везикул (ВВ), в особенности, экзосом [33]. ВВ – это гетерогенная группа частиц размером от 50 нм до 5 мкм, включающая в себя везикулы, происходящие из эндосом (в этом случае они называются экзосомами) и плазматической мембраны (в этом случае они называются эктосомами) и выделяемые большинством типов клеток [34]. Малыми называются ВВ, если их размер не превышает 200 нм. Экзосомы – мВВ эндосомального происхождения диаметром от 50 до 150 нм (в среднем 100 нм). Последовательная инвагинация ограничивающей мембраны первичной эндосомы приводит к образованию мультивезикулярных телец, которые впоследствии сливаются с плазматической мембраной и высвобождают свое содержимое (мВВ) во внеклеточную среду. мВВ содержат различные макромолекулы, включая ДНК, РНК, липиды, метаболиты, а также цитозольные и поверхностные белки клетки [35]. Они выделяются большинством типов клеток и могут быть обнаружены практически в любой биологической жидкости (кровь, моча, спинномозговая жидкость, слюна и т.д.) [36]. В настоящее время доказано, что мВВ играют важную роль в физиологии и патологии ЦНС, поскольку они представляют собой путь локальной и дистанционной коммуникации между нейронами и глияй, а также клетками других органов и тканей [37]. Из-за своей способности пересекать гематоэнцефалический барьер, и груза, который переносят мВВ (особенно микроРНК из-за их плеiotропности), они являются многообещающими кандидатами в биомаркеры и потенциально содержат клинически значимую информацию [38, 39]. Поиск маркеров состояний при психических расстройствах является основной целью изучения мВВ в психиатрии. С этой целью проводятся исследования мВВ при таких психических рас-

стройства как как шизофрения [38, 40] и биполярное расстройство [41], а также для оценки суицидального риска [42]. Кроме того, были выявлены изменения экзосомального профиля при различных болевых синдромах [43], что делает особенно перспективным изучение мВВ при НССП – расстройстве в основе которого лежит парадоксальное улучшение эмоционального состояния в ответ на болевые стимулы.

Существуют исследования, сравнивающие особенности концентрации и размеров мВВ в крови пациентов с психическими расстройствами. Yakovlev et al. (2019) определили, что концентрация мВВ в сыворотке крови, оцененная с использованием методов ДРС, АТН и ИФА, была статистически значимо повышена у пациентов с БДР по сравнению со здоровыми добровольцами [44]. Chen et al. (2023) с использованием АТН показали, что у пациентов с легким когнитивным нарушением концентрация мВВ в сыворотке крови была достоверно выше, а диаметр был меньше по сравнению со здоровым контролем [45]. В работе Rani et al. (2021), при исследовании концентрации и размеров мВВ в слюне у пациентов с болезнью Альцгеймера, было также установлено, что концентрация мВВ в слюне у этих пациентов достоверно выше по сравнению с здоровым контролем [46].

На сегодняшний день существуют лишь единичные исследования, посвященные изучению роли мВВ в формировании НССП. Целью настоящего исследования была отработка протокола выделения мВВ у пациентов с НССП и сравнение концентрации и размеров мВВ у пациентов с большой депрессией с НССП и без такового, а также оценка связи размеров и концентрации мВВ с такими параметрами как выраженность ситуативной и личностной тревоги, депрессии и суицидального риска.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. Исследование типа случай-контроль проводилось в ГБУЗ Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева Департамента здравоохранения города Москвы (ГБУЗ НПЦ им. Соловьева ДЗМ) с сентября 2022 г. по ноябрь 2022 г. Методом сплошного набора было включено 28 пациентов с текущим эпизодом большой депрессии и НССП за последние 12 мес. (основная группа) и затем была набрана группа сравнения из 28 пациентов с большой депрессией идентичных по полу и возрасту без НССП на протяжении жизни (общий размер выборки исследования 56 человек). Диагноз психического расстройства устанавливался опытным врачом-психиатром на основании результатов интервью Mini-International Neuropsychiatric Interview (MINI v 7.0.2) [47]. Критерии включения: 1) диагноз БДР

(текущий депрессивный эпизод), 2) возраст от 18 лет и старше, 3) свободное владение русским языком, 4) возможность дать информированное согласие и соблюдать протокол исследования, 5) количество биологического материала (сыворотка крови), достаточное для анализа мВВ; 6) для участников основной группы – соответствие диагностическим критериям НССП, представленным в секции III DSM-5TR [48]. Критерии исключения: 1) когнитивные нарушения (оценка 24 балла и меньше по шкале Mini-Mental State Examination (MMSE) [49], 2) первичные психотические расстройства в настоящее время или в прошлом, наличие гипоманиакальных или маниакальных фаз на протяжении жизни, 3) тяжелые сопутствующие соматические (например, сахарный диабет, аутоиммунные или онкологические заболевания) и неврологические расстройства (например, эпилепсия, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона). Все пациенты подписали форму информированного согласия для участия в исследовании до выполнения любых процедур, предусмотренных протоколом исследования. Все образцы крови были взяты в день обращения до назначения медикаментозной терапии. В дальнейшем пациенты получали медикаментозную терапию, предусмотренную протоколом лечения большой депрессии (TAU – treatment as usual). Для оценки тяжести депрессии использовали русскоязычную версию опросника депрессии Бека – II (BDI II) [50]. Для измерения личностной и ситуативной тревожности использовали русскоязычную версию опросника Спилбергера State-Trait Anxiety Inventory (STAI) [51]. Исследование проведено в полном соответствии с принципами Хельсинской декларации [52]. Дизайн исследования одобрен Локальным комитетом по этике научных исследований ГБУЗ НПЦ им. Соловьева ДЗМ.

Материал для исследования. Материалом для исследования служила сыворотка крови. Забор крови у пациентов проводили из локтевой вены в утренние часы натощак. Известно, что на образование мВВ оказывает влияние множество факторов, поэтому процедура взятия крови и преаналитический этап подготовки проб были максимально стандартизированы. Для всех проб были соблюдены одинаковые условия, а именно: время и способ забора крови, тип моновет и размер иглы (21.5 G); промежуток времени (не более 30 мин) и температура в помещении между взятием крови и центрифугированием (22–23°C); условия центрифугирования; условия хранения биологического материала на всех этапах анализа. У всех пациентов кровь брали до назначения терапии.

Выделение мВВ. Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования № 40606 ИВНД и НФ РАН “Функциональное картирование мозга”.

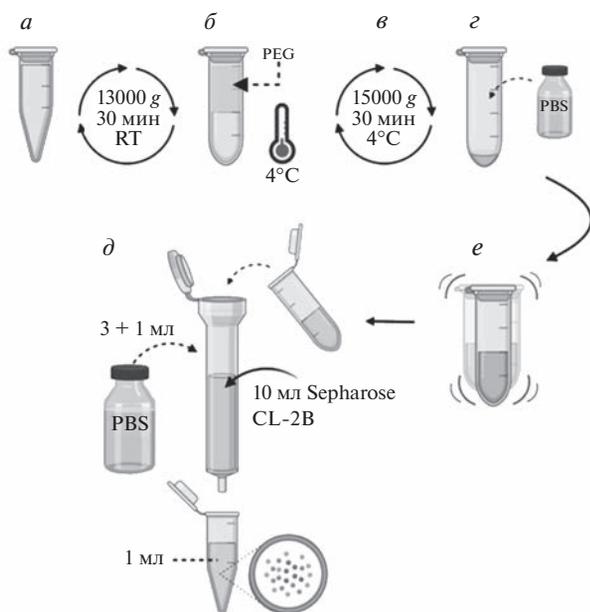


Рис. 1. На рисунке представлен протокол выделения малых внеклеточных везикул. Подробное описание каждого этапа см. в тексте.

Для избавления от крупных примесей, агрегатов макромолекул и остатков клеток сыворотку быстро размораживали при 37°C и центрифугировали при 13000 *g* 30 мин при комнатной температуре (рис. 1а). Для получения грубой фракции мВВ, супернатант переносили в новые пробирки, смешивали 1 к 1 с 6% полиэтиленгликолем (PEG 6000) и охлаждали 30 мин при 4°C (рис. 1б). После этого исследуемый материал центрифугировали при 1500 *g* 30 мин при 4°C (рис. 1в). В результате в осадок выпадала грубая фракция мВВ, которую отмывали небольшим количеством водно-солевого буфера (PBS) (рис. 1г). Затем осадок растворяли в PBS для дальнейшего выделения (рис. 1д). Для получения чистой фракции мВВ растворенный осадок подвергали гель-фильтрации через колонку, набитую Sepharose CL-2B в объеме 10 мл (наносили 0.5 мл пробы, промывали 3мл PBS, проводили элюцию в 1 мл PBS) (рис. 1е). В результате гель-фильтрации получали фракцию везикул, необходимую для последующего изучения. Чтобы удостовериться, что полученные везикулы являются мВВ диаметром от 50 до 150 нм, в дальнейшем проводили инструментальное определение размеров везикул с помощью ДРС и АТН.

Анализ траекторий наночастиц. АТН выполняли на приборе NanoSight NS300 (Malvern Panalytical, Великобритания). Этот метод является наиболее распространенным методом, используемым для оценки концентраций и размеров ВВ в растворе. Этот метод опирается на измерение характерного движения мВВ (и наночастиц в це-

лом) в растворе на основе броуновского движения [53]. Каждый образец разводили в 200 раз в 0.05% NP-40, прокачивали с помощью шприцевого насоса через проточную кювету и записывали два видео по 30 с каждое. Полученные видео обрабатывали при следующих настройках встроенной программы обработки видеофайлов: Detect Threshold: 5, Blur Size: 2-pass, Max Jump Distance: Manual: 12.0 pix.

Динамическое светорассеяние. ДРС также известно как фотонная корреляционная спектроскопия, является альтернативным методом измерения размера мВВ [54]. ДРС фракции мВВ определяли с помощью прибора Zetasizer Nano S производства Malvern Panalytical (Великобритания). В кварцевую кювету наливали 1 мл разведенной в 5 раз в 0.05% NP-40 фракции мВВ и определяли светорассеяние за четыре повтора по 20 с каждый. Оборудование позволяет определить число отраженных фотонов, выражаемое в тысячах фотонов в секунду, *ксрс*. Общее число отраженных фотонов используется для вычисления размера частиц, но может служить и самостоятельным параметром, характеризующим образец. В нашей предыдущей работе мы показали, что число фотонов является надежным показателем, характеризующим число мВВ в образце [44].

Статистический анализ и представление результатов. Статистическую обработку результатов проводили в программе StatPlus:macPro ver.8. Для сравнения групп использовали дисперсионный анализ, для анализа связи между переменными использовали ранговую корреляцию Спирмена. В качестве апостериорного теста использовали *U*-критерий Манна–Уитни. Для сравнения качественных переменных использовали критерий χ -квадрат. Достоверным считали уровень значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Основную группу составили 28 пациентов с эпизодом униполярной депрессии и НССП: мужской пол при рождении имели 11 (39.3%), женский – 17 (60.7%) пациентов. Средний возраст участников составил 28.3 года (самый младший участник – 19 лет, самый старший участник – 38 лет). Контроль был составлен из пропорции 1 : 1, полностью совпадал по полу и психиатрическому диагнозу с основной группой. Группы значительно различались по выраженности депрессии по опроснику BDI-II (34.9 балла в группе с НССП против 26.0 баллов в группе сравнения; $p < 0.001$); шкале ситуационной тревоги Спилбергера (63.6 балла в группе НССП против 56.8 балла в группе сравнения; $p < 0.01$) и шкале личностной тревоги Спилбергера (65.2 балла в группе НССП против 57.8 баллов в группе сравнения; $p < 0.01$). Оценка суицидального риска, проведенная по соответ-

Таблица 1. Социо-демографические и клинические характеристики исследованных групп

Параметр	НССП (<i>n</i> = 28)	Без НССП (<i>n</i> = 28)	<i>P</i> -значение
Пол, мужчины	11 (39.3%)	11 (39.3%)	нд*
Средний возраст, лет	28.3	28.2	нд*
Семейное положение			
В браке, <i>n</i> (%)	5 (18%)	8 (29%)	нд**
Вдовство, <i>n</i> (%)	1 (4%)	0 (0%)	
Развод, <i>n</i> (%)	2 (7%)	3 (11%)	
Холост, <i>n</i> (%)	15 (53%)	16 (57%)	
В отношениях, <i>n</i> (%)	5 (18%)	1 (3%)	
Образование			
Высшее/неоконченное высшее, <i>n</i> (%)	23 (82%)	23 (82%)	нд**
Среднее специальное, <i>n</i> (%)	2 (7%)	4 (14%)	
Среднее, <i>n</i> (%)	3 (11%)	1 (4%)	
Трудовая занятость			
Работает, <i>n</i> (%)	13 (46%)	12 (43%)	нд**
Не работает, <i>n</i> (%)	14 (50%)	12 (43%)	
Учеба, <i>n</i> (%)	1 (4%)	4 (14%)	
Клинические шкалы			
BDI II, баллы	34.9	26.0	<i>p</i> < 0.001*
Шкала Спилбергера (Ситуационная), баллы	63.6	56.8	<i>p</i> < 0.01*
Шкала Спилбергера (Личностная), баллы	65.2	57.8	<i>p</i> < 0.01*
MINI, суицидальный риск			
Нет риска/низкий риск, N	7	23	<i>p</i> < 0.0001**
Средний/высокий риск, N	21	5	

* *U*-критерий Манна–Уитни; ** тест χ -квадрат.

ствующему модулю опросника MINI, также выявила различия между группами. В группе пациентов с БДР и НССП участники со средним и высоким суицидальным риском встречались значительно чаще ($p < 0.0001$; согласно тесту χ -квадрат). Основные социо-демографические и клинические данные групп представлены в табл. 1.

Основные количественные характеристики выделенных мВВ представлены в табл. 2. АТН не выявил значимой разницы в размере (95.3 нанометров в группе НССП против 93 нанометра группы сравнения; $p = 0.4$) и концентрации мВВ ($8.96E+10$ частиц/мл в группе НССП против $9.48E+10$ частиц/мл группы сравнения; $p = 0.7$). ДРС также не выявил достоверных различий в размерах (85.9 нанометров в группе НССП против 85.6 нанометров контроля; $p = 0.67$) и уровне сигнала (2663.42 кcps в группе НССП против 2747.72 кcps контроля; $p = 0.86$).

Дополнительно нами была проведена оценка связи размеров и концентрации мВВ в выборке с такими параметрами как выраженность ситуативной и личностной тревоги, депрессии и суицидального риска. Поскольку АТН является одним из основных методов определения количественных характеристик мВВ [34], дальнейший анализ проводился с использованием результатов этого метода. Проведенный анализ не выявил зависимости концентрации и размера мВВ от вышеперечисленных параметров у пациентов с БДР. Результаты представлены на рис. 2.

ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Набор в основную группу проводился путем последовательного включения поступающих на лечение пациентов с депрессивным эпизодом и НССП. Половой и возрастной состав группы совпадают с данными литературы о преобладании

Таблица 2. Количественные характеристики мВВ из крови пациентов разных групп

Параметр	НССП (<i>n</i> = 28)	Без НССП (<i>n</i> = 28)	<i>P</i> -значение
АТН			
Диаметр, нм	95/3	93/0	нд*
Концентрация, частиц/мл	8.96E + 10	9.48 E + 10	нд*
ДРС			
Диаметр, нм	85.9	85.6	нд*
Число рассеянных фотонов, тысяч/с	2663.4	2747.7	нд*

* *U*-критерий Манна–Уитни.

среди пациентов с НССП молодых лиц женского пола [55]. Ранее данная тенденция выявлялась в исследовании московской популяции пациентов с непсихотическими психическими расстройствами [56]. В то же время преобладание женщин в выборке может быть и отражением паттерна обращаемости за психиатрической помощью. Полученные нами результаты подтверждают данные литературы о том, что при клинической депрессии наличие НССП связано с более тяжелыми клиническими проявлениями (выраженность депрессии, ситуативной и личностной тревоги) [57, 58], а также более высоким суицидальным риском [59, 60].

Область изучения внеклеточных везикул при психических расстройствах остается относительно новой, однако убедительные данные из других областей указывают на то, что изучение внеклеточных везикул может пролить свет на механизмы, лежащие в основе патогенеза психических заболеваний, а также повысить точность прогнозирования терапевтического ответа. Большинство проведенных исследований в области самоповреждающего поведения посвящены изучению роли микроРНК в патогенезе суицидального поведения, с использованием данных, полученных в ходе изучения мВВ [61]. На сегодняшний день нам удалось найти лишь 2 исследования, изучающие роль микроРНК в патогенезе несуицидального типа самоповреждающего поведения.

В исследовании Wang et al. (2021) типа случай–контроль в выборке из 15 пациентов с депрессией, установленной согласно Диагностическому и статистическому руководству по психическим расстройствам 5-го издания (DSM 5) [62], и опытом НССП была выявлена роль гена SIRT1 в патогенезе НССП [63]. Ранее выявлялась ассоциация данного гена с такими клиническими симптомами как когнитивные нарушения, нарушение сна, чувство вины, суицидальное поведение и симптомы сексуальной дисфункции у пациентов с депрессией. В исследовании Chen et al. (2022) у пациентов с депрессией, установленной согласно DSM 5, и опытом НССП была выявлена повышенная регуляция hsa-miR-122-5p, hsa-miR-202-5p и

hsa-miR-365a/b-3p и пониженная регуляция новых-hsa-miR-311-5p, hsa-miR-1976 и новый hsa-miR-105-5p [64]. К сожалению, оба исследования имеют свои ограничения, основанные на включении малого количества участников выборки пациентов (10 человек в исследовании Chen et al. (2022), 15 человек в исследовании Wang et al. (2021)), и связанной с этим возможной предвзятостью.

Результаты нашего исследования подтверждают потенциальную возможность использования внеклеточных везикул в исследовании этиологии и патогенеза несуицидального самоповреждения. В нашем исследовании с дизайном типа кейс-контроль с подбором пациентов идентичных по полу, возрасту и диагнозу не было выявлено различий в концентрации и размерах мВВ в зависимости от наличия или отсутствия НССП. Также нам не удалось выявить зависимости концентрации и размеров мВВ от выраженности депрессии, ситуативной и личностной тревоги и тяжести суицидального риска. Нам не удалось найти исследования сравнения подобных параметров.

ОГРАНИЧЕНИЯ

Нами впервые был отработан протокол выделения мВВ и определена концентрация и размер мВВ у пациентов с БДР с и без НССП. К числу достоинств нашего исследования относится сплошной набор пациентов основной группы с депрессивным эпизодом и НССП, обратившихся за психиатрической помощью, что уменьшает вероятность ошибки при наборе. Другим достоинством является диагностика депрессивного эпизода и проведение оценки суицидального риска путем проведения интервью MINI, представляющего собой в настоящее время “золотой стандарт” диагностики. Еще одним достоинством исследования является подбор пациентов группы сравнения, полностью совпадающие по полу, возрасту и психиатрическому диагнозу.

В то же время наше исследование имеет ряд ограничений. Первое связано с половыми и возрастными характеристиками участников. В на-

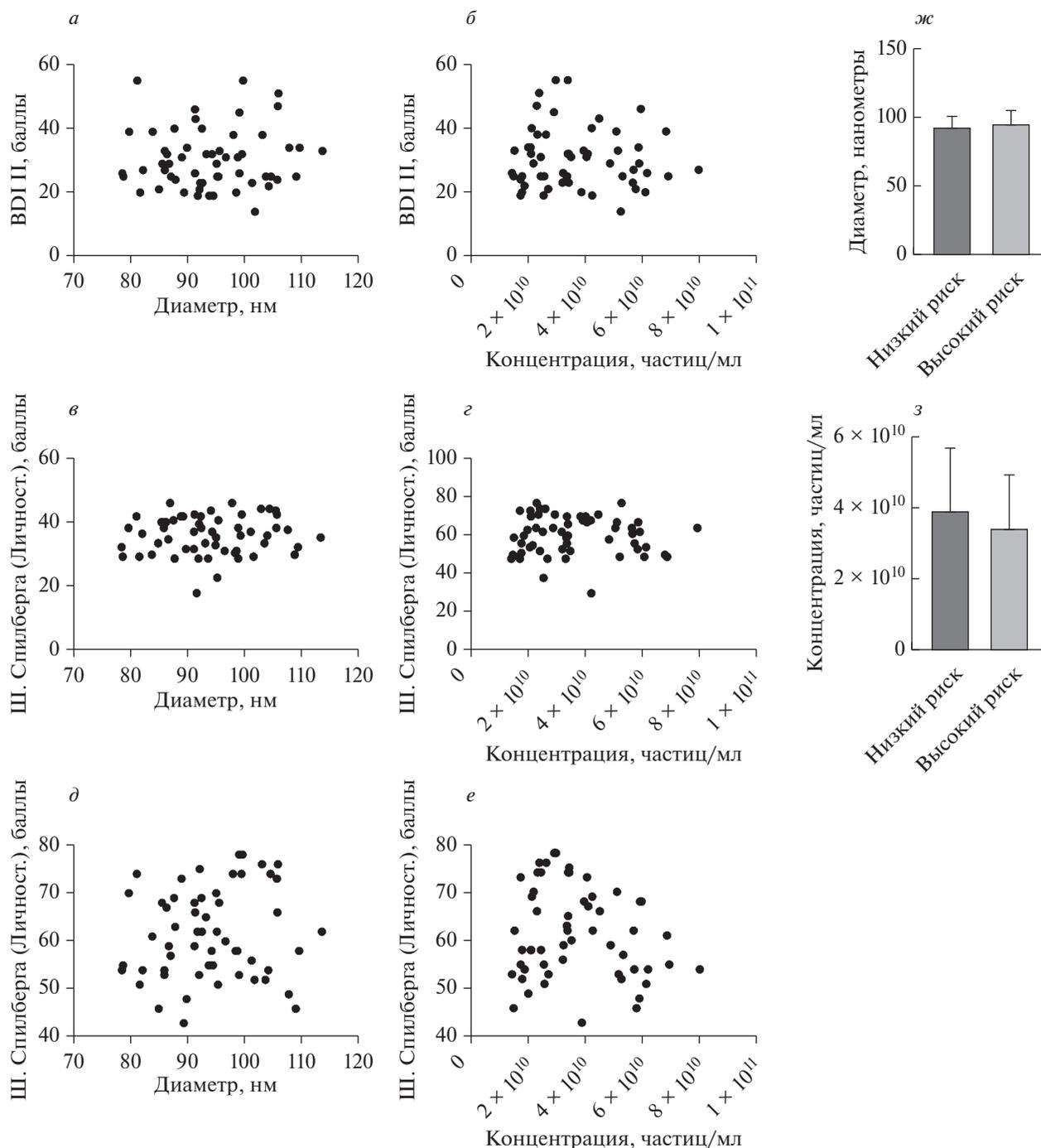


Рис. 2. На рисунке представлены результаты оценки связи размеров и концентрации мВВ в выборке с такими параметрами как выраженность депрессии (*а*, *б*), ситуативной тревоги (*в*, *з*), личностной тревоги (*д*, *е*) и суицидального риска (*ж*, *з*).

шем исследовании преобладали женщины и молодые взрослые. В то же время данное распределение отражает половозрастные характеристики лиц с НССП вообще и подобные пропорции встречаются в большинстве исследований данной клинической популяции в мире. Второе ограничение связано с большей тяжестью эмоциональ-

ных расстройств у участников основной группы, что могло повлиять на результаты. В то же время по данным большинства исследований НССП ассоциировано с более тяжелым течением психических расстройств и рядом неблагоприятных исходов, включая суицидальные попытки [65], что также нашло отражение в нашей выборке. Кли-

нический профиль участников основной группы совпадает с наблюдаемым у большинства пациентов с НССП и депрессивным эпизодом в повседневной практике врача-психиатра.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше исследование не выявило количественных особенностей мВВ у пациентов с депрессивным эпизодом с и без НССП. Будущие исследования должны быть направлены на исследование структурных отличий и функциональных особенностей мВВ при НССП.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Автономной некоммерческой организацией “Московский центр инновационных технологий в здравоохранении”, грант № 2412–36/22.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Исследование проведено в полном соответствии с принципами Хельсинской декларации. Дизайн исследования одобрен Локальным комитетом по этике научных исследований ГБУЗ НПЦ им. Соловьева ДЗМ.

Информированное согласие. Все пациенты подписали форму информированного согласия для участия в исследовании до выполнения любых процедур, предусмотренных протоколом исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Blasco-Fontecilla H., Artieda-Urrutia P., de Leon J.* // *Epidemiol. Psychiatr. Sci.* 2019. V. 28. № 5. P. 473.
2. *Roth G.A., Mensah G.A., Johnson C.O., Addolorato G., Ammirati E., Baddour L.M., Barengo N.C., Beaton A., Benjamin E.J., Benziger C.P. et al.* // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2020. V. 76. № 25. P. 2982.
3. *Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A.* // *CA Cancer J. Clin.* 2022. V. 72. № 1. P. 7–33.
4. *World Health Organization* // World Health Organization, Geneva 2021. P. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
5. *McMillan K.A., Enns M.W., Asmundson G.J.G., Sareen J.* // *J. Clin. Psychiatry* 2010. V. 71. № 9. P. 1168–1175.
6. *Adams D.M., Overholser J.C., Spirito A.* // *Can J. Psychiatry* 1994. V. 39. № 1. P. 43–48.
7. *Slap G., Goodman E., Huang B.* // *Pediatrics.* 2001. V. 108. № 2.
8. *Kattimani S., Sarkar S., Rajkumar R.P., Menon V.* // *J. Neurosci. Rural. Pract.* 2015. V. 6. № 2. P. 171.
9. *Thomas N., Armstrong C.W., Hudaib A.R., Kulkarni J., Gurvich C.* // *Front. Neuroendocrinol.* 2021. V. 63.
10. *Cha C.B., Franz P.J., M. Guzmán E., Glenn C.R., Kleiman E.M., Nock M.K.* // *J. Child. Psychol. Psychiatry.* 2018. V. 59. № 4. P. 460.
11. *Racine M.* // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2018. V. 87. № Pt B. P. 269–280.
12. *Dong M., Lu L., Sha S., Zhang L., Zhang Q., Ungvari G.S., Balbuena L., Xiang Y.T.* // *Psychosom. Med.* 2021. V. 83. № 7. P. 739–745.
13. *Giambarberi L., Munger Clary H.M.* // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2022. V. 22. № 8. P. 441–450.
14. *Shepard M.D., Perepezko K., Broen M.P.G., Hinkle J.T., Butala A., Mills K.A., Nanavati J., Fischer N.M., Nestadt P., Pontone G.* // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2019. V. 90. № 7. P. 822–829.
15. *Quevedo L. de A., Loret de Mola C., Pearson R., Murray J., Hartwig F.P., Gonçalves H., Pinheiro R.T., Gigante D.P., Motta J.V. dos S., Quadros L. de C.M., Barros F.C., Horta B.L.* // *Compr. Psychiatry.* 2020. V. 102.
16. *Gili M., Castellví P., Vives M., de la Torre-Luque A., Almenara J., Blasco M.J., Cebrià A.I., Gabilondo A., Pérez-Ara M.A., Lagares C., Parés-Badell O., Piqueras J.A., Rodríguez-Jiménez T., Rodríguez-Marín J., Soto-Sanz V., Alonso J., Roca M.* // *J. Affect. Disord.* 2019. V. 245. P. 152–162.
17. *Too L.S., Spittal M.J., Bugeja L., Reifels L., Butterworth P., Pirkis J.* // *J. Affect. Disord.* 2019. V. 259. P. 302–313.
18. *Nock M.K., Green J.G., Hwang I., McLaughlin K.A., Sampson N.A., Zaslavsky A.M., Kessler R.C.* // *JAMA Psychiatry.* 2013. V. 70. № 3. P. 300–310.
19. *Klonsky E.D., May A.M., Saffer B.Y.* // *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 2016. V. 12. P. 307–330.
20. *Nock M.K.* // *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 2010. V. 6. P. 339–363.
21. *Xiao Q., Song X., Huang L., Hou D., Huang X.* // *Front. Psychiatry.* 2022. V. 13.
22. *Griep S.K., MacKinnon D.F.* // *Arch. Suicide Res.* 2022. V. 26. № 2. P. 428–446.
23. *Boyne H., Hamza C.A.* // *Psychiatry Res.* 2022. V. 318.
24. *Stacy S.E., Pepper C.M., Clapp J.D., Reyna A.H.* // *J. Clin. Psychol.* 2022. V. 78. № 5. P. 926–937.
25. *Hankin B.L., Barrocas A.L., Young J.F., Haberstick B., Smolen A.* // *Psychiatry Res.* 2015. V. 225. № 3. P. 609–612.
26. *Gao Y., Xiong Y., Liu X., Wang H.* // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2021. V. 18. № 5. P. 1–13.
27. *Martín-Blanco A., Ferrer M., Soler J., Salazar J., Vega D., Andión O., Sanchez-Mora C., Arranz M.J., Ribases M., Feliu-Soler A., Pérez V., Pascual J.C.* // *J. Psychiatr. Res.* 2014. V. 57. № 1. P. 34–40.
28. *Kaess M., Hille M., Parzer P., Maser-Gluth C., Resch F., Brunner R.* // *Psychoneuroendocrinology.* 2012. V. 37. № 1. P. 157–161.
29. *Koenig J., Rinnewitz L., Warth M., Hillecke T.K., Brunner R., Resch F., Kaess M.* // *J. Psychiatry Neurosci.* 2017. V. 42. № 3. P. 189–199.

30. Kirtley O.J., O'Carroll R.E., O'Connor R.C. // *J. Affect. Disord.* 2016. V. 203. P. 347–363.
31. Kaess M., Hooley J.M., Klimes-Dougan B., Koenig J., Plener P.L., Reichl C., Robinson K., Schmahl C., Sicorello M., Westlund Schreiner M., Cullen K.R. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2021. V. 130. P. 228–239.
32. Sparrow-Downes V.M., Trincao-Batra S., Cloutier P., Helleman A.R., Salamatanmanesh M., Gardner W., Baksh A., Kapur R., Sheridan N., Suntharalingam S., Currie L., Carrie L.D., Hamilton A., Pajer K. // *BMC Psychiatry.* 2022. V. 22. № 1.
33. Saeedi S., Israel S., Nagy C., Turecki G. // *Transl. Psychiatry.* 2019. V. 9. № 1.
34. Théry C., Witwer K.W., Aikawa E., Alcaraz M.J., Anderson J.D., Andriantsitohaina R., Antoniou A., Arab T., Archer F., Atkin-Smith G.K. et al. // *J. Extracell. Vesicles.* 2018. V. 7. № 1.
35. Kalluri R., LeBleu V.S. // *Science.* 2020. V. 367. № 6478.
36. Yáñez-Mó M., Siljander P.R.M., Andreu Z., Zavec A.B., Borràs F.E., Buzas E.I., Buzas K., Casal E., Cappello F., Carvalho J., Colás E., Cordeiro-Da Silva A., Fais S., Falcon-Perez J.M., Ghobrial I.M., Giebel B., Gimona M., Graner M., Gursel I., Gursel M., Heegaard N.H.H., Hendrix A., Kierulff P., Kokubun K., Kosanovic M., Kralj-Iglic V., Krämer-Albers E.M., Laitinen S., Lässer C., Lener T., Ligeti E., Line A., Lipps G., Llorente A., Lörvall J., Manček-Keber M., Marcilla A., Mittelbrunn M., Nazarenko I., Nolte-'t Hoen E.N.M., Nyman T.A., O'Driscoll L., Olivan M., Oliveira C., Pällinger É., del Portillo H.A., Reventós J., Rigau M., Rohde E., Sammar M., Sánchez-Madrid F., Santarém N., Schallmoser K., Ostenfeld M.S., Stoorvogel W., Stukelj R., van der Grein S.G., Helena Vasconcelos M., Wauben M.H.M., de Wever O. // *J. Extracell. Vesicles.* 2015. V. 4. № 2015. P. 1–60.
37. Janas A.M., Sapoń K., Janas T., Stowell M.H.B., Janas T. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1858. № 6. P. 1139–1151.
38. Gruzdev S.K., Yakovlev A.A., Druzhkova T.A., Guekht A.B., Gulyaeva N.V. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2019. V. 39. № 6. P. 729–750.
39. Khaspeckov L.G., Yakovlev A.A. // *Neurochemical J.* 2023. V. 39. № 1. P. 1–18.
40. Wang Y., Amdanee N., Zhang X. // *Eur. Psychiatry.* 2022. V. 65. № 1.
41. Clausen A.R., Durand S., Petersen R.L., Staunstrup N.H., Qvist P. // *Genes (Basel).* 2022. V. 13. № 6.
42. Kouter K., Paska A.V. // *Epigenomics.* 2020. V. 12. № 24. P. 2219–2235.
43. D'Agnelli S., Gerra M.C., Bignami E., Arendt-Nielsen L. // *Mol. Pain.* 2020. V. 16.
44. Yakovlev A.A., Druzhkova T.A., Nikolaev R.V., Kuznetsova V.E., Gruzdev S.K., Guekht A.B., Gulyaeva N.V. // *Neurochemical Journal.* 2019. V. 13. № 4. P. 385–390.
45. Chen B., Song L., Yang J., Zhou W.Y., Cheng Y.Y., Lai Y.J. // *Neural Regen. Res.* 2023. V. 18. № 3. P. 587.
46. Rani K., Rastogi S., Vishwakarma P., Bharti P.S., Sharma V., Renu K., Modi G.P., Vishnu V.Y., Chatterjee P., Dey A.B., Nikolajeff F., Kumar S. // *J. Neurosci. Methods.* 2021. V. 347.
47. Sheehan D.V., Lecrubier Y., Sheehan K.H., Amorim P., Janavs J., Weiller E., Hergueta T., Baker R., Dunbar G.C. // *J. Clin. Psychiatry.* 1998. V. 59. № suppl. 20. P. 11980.
48. <https://www.appi.org/dsm>. Accessed March 1, 2023.
49. Cockrell J.R., Folstein M.F. // *Psychopharmacol. Bull.* 1988. V. 24. № 4. P. 689–692.
50. Beck A.T., Steer R.A., Brown G.K. // San Antonio, TX: Psychological Corporation. 1996. P. 1–82.
51. Spielberger C.D., Gorsuch R.L., Lushene R.E. // *Manual for the State-Trait Anxiety Inventory.* Palo Alto. Consulting Psychologists Press. 1970.
52. *World Medical Association Declaration of Helsinki Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects* // *JAMA.* 2013. V. 310. № 20. P. 2191–2194.
53. Bachurski D., Schuldner M., Nguyen P.H., Malz A., Reiners K.S., Grenzi P.C., Babatz F., Schauss A.C., Hansen H.P., Hallek M., Pogge von Strandmann E. // *J. Extracell. Vesicles.* 2019. V. 8. № 1.
54. Szatanek R., Baj-Krzyworzeka M., Zimoch J., Lekka M., Siedlar M., Baran J. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 6.
55. Wilkinson P.O., Qiu T., Jesmont C., Neufeld S.A.S., Kaur S.P., Jones P.B., Goodyer I.M. // *J. Affect. Disord.* 2022. V. 306. P. 240–245.
56. Zinchuk M., Beghi M., Beghi E., Bianchi E., Avedisova A., Yakovlev A., Guekht A. // *Arch. Suicide Res.* 2022. V. 26. № 2. P. 776–800.
57. Giner-Bartolome C., Mallorquí-Bagué N., Tolosa-Sola I., Steward T., Jimenez-Murcia S., Granero R., Fernandez-Aranda F. // *Front. Psychol.* 2017. V. 8. P. 1163.
58. Lee H.S., Park K.J., Kwon Y., Shon S.H., Youngstrom E.A., Kim H.W. // *Psychiatry Investig.* 2021. V. 18. № 6. P. 561–569.
59. Asarnow J.R., Porta G., Spirito A., Emslie G., Clarke G., Wagner K.D., Vitiello B., Keller M., Birmaher B., McCracken J., Mayes T., Berk M., Brent D.A. // *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry.* 2011. V. 50. № 8. P. 772–781.
60. Wilkinson P., Kelvin R., Roberts C., Dubicka B., Goodyer I. // *Am. J. Psychiatry.* 2011. V. 168. № 5. P. 495–501.
61. Kouter K., Paska A.V. // *Epigenomics.* 2020. V. 12. № 24. P. 2219–2235.
62. *American Psychiatric Association* // *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders.* May 2013.
63. Wang L., Zheng D., Liu L., Zhong G., Bi X., Hu S., Wang M., Qiao D. // *Medicine.* 2021. V. 100. № 31. P. E26747.
64. Chen Q., Liu X., Xu R., Wang X., Zhou D., Tang Y. // *Asian J. Psychiatr.* 2023. V. 80.
65. Ye Z., Xiong F., Li W. // *Front. Psychiatry.* 2022. V. 13.

Quantitative Characteristics of Small Extracellular Vesicles from the Blood of Patients with Non-Suicidal Self-Harm

I. N. Mishin^a, M. S. Zinchuk^a, T. A. Druzhkova^a,
N. V. Gulyaeva^{a, b}, A. B. Guekht^{a, c}, and A. A. Yakovlev^{a, b}

^aResearch and Clinical Center for Neuropsychiatry of Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

^bDepartment of Functional Biochemistry of Nervous System, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^cDepartment of Neurology, Neurosurgery and Medical Genetics, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

Objective of the study – determination of quantitative characteristics of small extracellular vesicles (sEV) in the blood of patients with non-suicidal self-injury (NSSI) and comparison of the concentration and size of sEV's in patients with major depressive disorder (MDD) with and without NSSI, as well as an assessment of the relationship between the sizes and concentrations of sEV in the sample with such parameters as the severity of situational and personal anxiety, depression and suicidal risk. The study included 28 patients (11 m./17 f.) with a current episode of major depression and at least five episodes of NSSI in the last 12 months (main group, mean age 28.3 years) and 28 patients with major depression identical in sex and age without NSSI throughout life (comparison group). Patient mental status was assessed using the MINI interview, the Beck Depression Inventory II (BDI II), and the Spielberger Anxiety Scale. Isolation of sEV from blood was carried out using polyethylene glycol (PEG) precipitation and gel filtration. The size and concentration of isolated particles were estimated using dynamic light scattering (DLS) and nanoparticle tracking analysis (ATN). The groups differed significantly in the severity of depression according to the BDI-II questionnaire, the Spielberger Situational Anxiety Scale, and the Spielberger Personality Anxiety Scale. The assessment of suicidal risk, carried out according to the corresponding module of the MINI questionnaire, revealed a significantly larger number of participants with medium and high suicidal risk in the group of patients with NSSI. The sEV fraction was isolated from the blood of the patients of the main group and the comparison group. There were no differences in the concentration and size of sEV between groups of patients with depression with and without NSSI. In our study, the dependence of the concentration and size of sEV on the severity of depression, situational and personal anxiety, and the severity of suicidal risk wasn't revealed. Conclusion: NSSI in individuals with major depressive disorder is associated with a more severe course of the disorder (greater severity of depression, situational and personal anxiety), as well as a higher risk of suicide. Our study did not reveal any differences in the quantitative characteristics of sEV in patients with a depressive episode with and without NSSI. Future studies should focus on investigating the structural differences and functional features of sEV in NSSI.

Keywords: nonsuicidal self-injury behavior, depression, suicidality, small extracellular vesicles, dynamic light scattering, nanoparticle tracking analysis

УДК 577.121.7;616.89-02

АНОМАЛИИ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ШИЗОФРЕНИИ И ВОЗМОЖНЫЕ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИ-ОРИЕНТИРОВАННЫЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ

© 2023 г. И. С. Бокша¹, Т. А. Прохорова¹, О. К. Савушкина¹ *,
Е. Б. Терешкина¹, Е. А. Воробьева¹, Г. Ш. Бурбаева¹

¹Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Научный центр психического здоровья”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 14.02.2023 г.

После доработки 03.04.2023 г.

Принята к публикации 04.04.2023 г.

Скоординированная регуляция процессов превращения энергии в головном мозге обеспечивает его высокопродуктивную работу и эффективность психической деятельности. Нарушения энергетического метаболизма рассматриваются в качестве одного из патогенетических факторов развития шизофрении, но на сегодняшний день сложно сказать, первичны ли эти нарушения и являются ли они одной из непосредственных причин развития заболевания или представляют собой следствие изменений в работе нейромедиаторных и других нейрохимических систем. В настоящем обзоре рассматриваются основные результаты исследований — на различных уровнях и разными подходами — энергетического метаболизма при шизофрении, а также некоторые попытки воздействия на энергетические процессы в мозге в качестве дополнительной терапии при шизофрении. Эффективность этих терапевтических подходов на сегодняшний день не доказана, что может быть связано с малочисленностью исследований и отсутствием предварительного выделения/стратификации подгрупп больных, для которых “энерготропная” терапия была бы наиболее эффективна. На основании полученных данных можно сделать вывод о необходимости проведения анализа связей между психопатологическими проявлениями шизофрении и нарушениями энергетического обмена в целях выделения подгрупп больных, для которых применение митохондриальных модуляторов, митопротекторов и других подходов может представлять перспективный метод дополнительной терапии.

Ключевые слова: шизофрения, энергетический обмен, терапевтические подходы, митохондрии, гликолиз

DOI: 10.31857/S1027813323040088, **EDN:** PGI0EM

В настоящее время диагноз шизофрения выставляется исключительно на основании клинической психиатрической симптоматики, представляющей сложный комплекс симптомов, обусловленных нарушением мышления (симптомы клинически относят к позитивным, негативным, общей психопатологии); для заболевания характерны нарушения когнитивных познавательных процессов, исполнительных функций, расстройство концентрации внимания. Шизофрения — ге-

терогенное заболевание, и выраженность ее отдельных симптомов сильно варьирует, что признается одной из главных проблем на пути поиска эффективной фармакотерапии. Кроме шизофрении к шизофреническому спектру относят также шизоаффективное расстройство, шизотипическое расстройство, первичные острые психозы и бредовые расстройства. В рамках данного обзора мы рассмотрим только данные о шизофрении и шизоаффективном расстройстве. Для терапии психоза (психотического состояния) и предупреждения релапсов при этих заболеваниях применяют антипсихотики, которые являются лигандами рецепторов нейромедиаторов — преимущественно дофамина и серотонина. Хотя рецепторные профили современных атипичных антипсихотиков весьма различаются, облегчают они в первую очередь и главным образом тяжесть позитивной симптоматики, но отнюдь не всех психотических симптомов, а состояние многих больных резистентно к действию антипсихотиков. Также при

Принятые сокращения: АЛК — альфа-липовая кислота, КК ВВ — мозговая изоформа креатинкиназы, КрФ — креатинфосфат, мтКК — митохондриальная изоформа креатинкиназы, s-мтКК — саркомерная митохондриальная креатинкиназа, u-мтКК — повсеместно распространенная митохондриальная креатинкиназа, ЦО — цитохром с-оксидаза, ЦТК — цикл трикарбоновых кислот, ЭТЦ — электронно-транспортная цепь, НК — гексокиназа, НАС — N-ацетилцистеин.

* Адресат для корреспонденции: 115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, д. 34, e-mail: osavushkina1@yandex.ru.

применении антипсихотиков проявляются значительные побочные эффекты, неразрывно связанные с механизмом действия нейролептиков: прибавка веса, метаболический синдром, сердечно-сосудистые расстройства. Поэтому поиск новых лекарств при шизофрении связан с открытием новых альтернативных лекарственных терапевтических мишеней. На пути их разработки, наряду с гетерогенностью заболевания, стоит также проблема ограниченного понимания этиологии и патофизиологии шизофрении [1].

Современные концепции патогенеза шизофрении включают нарушение дофаминергической и глутаматергической нейромедиаторных систем [2] и провоспалительные процессы – как системные, так и ЦНС [3]. В качестве дополнительного патологического фактора при шизофрении рассматривается нарушение энергетического метаболизма – как в мозге, так и в организме в целом [4, 5].

Энергетическое состояние головного мозга является основой, обеспечивающей его высокопродуктивную работу и эффективность психической деятельности. Энергетический обмен характеризует функциональное состояние головного мозга и его физиологическую активность. На сегодняшний день сложно сказать, являются ли нарушения энергетического метаболизма/митохондриально-опосредованный патогенез шизофрении одной из основных причин развития заболевания или следствием – реакцией на отклонения в работе нейромедиаторных и других нейрохимических систем.

Вклад нарушений энергетического метаболизма в патогенез шизофрении интенсивно обсуждается в научной литературе [6, 7], но попыток тера-

певтических подходов к его коррекции известно немного.

Целью данной работы является обзор достижений в области изучения нарушений энергетического метаболизма при шизофрении и возможных терапевтических подходов, которые могут быть направлены на его коррекцию.

1. НОРМАЛЬНЫЙ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ МОЗГА. СОПРЯЖЕНИЕ НЕЙРОНОВ И ГЛИИ

Почти 3/4 энергетического запаса серого вещества используется при передаче нервных импульсов [8] и связано это с тем, что изменение постсинаптического потенциала зависит от наличия устойчивых ионных градиентов, опосредованных действием АТФ-зависимых насосов, в частности, градиента Na^+ , регулирующего также концентрацию других ионов, таких как Ca^{2+} , Mg^{2+} , H^+ и Cl^- , которые транспортируются или обмениваются с Na^+ для поддержания их физиологических уровней в клетках (или вне клеток). Высокая потребность мозга в энергии является следствием большого количества нейронов (синапсов), передающих десятки или сотни нервных импульсов в секунду.

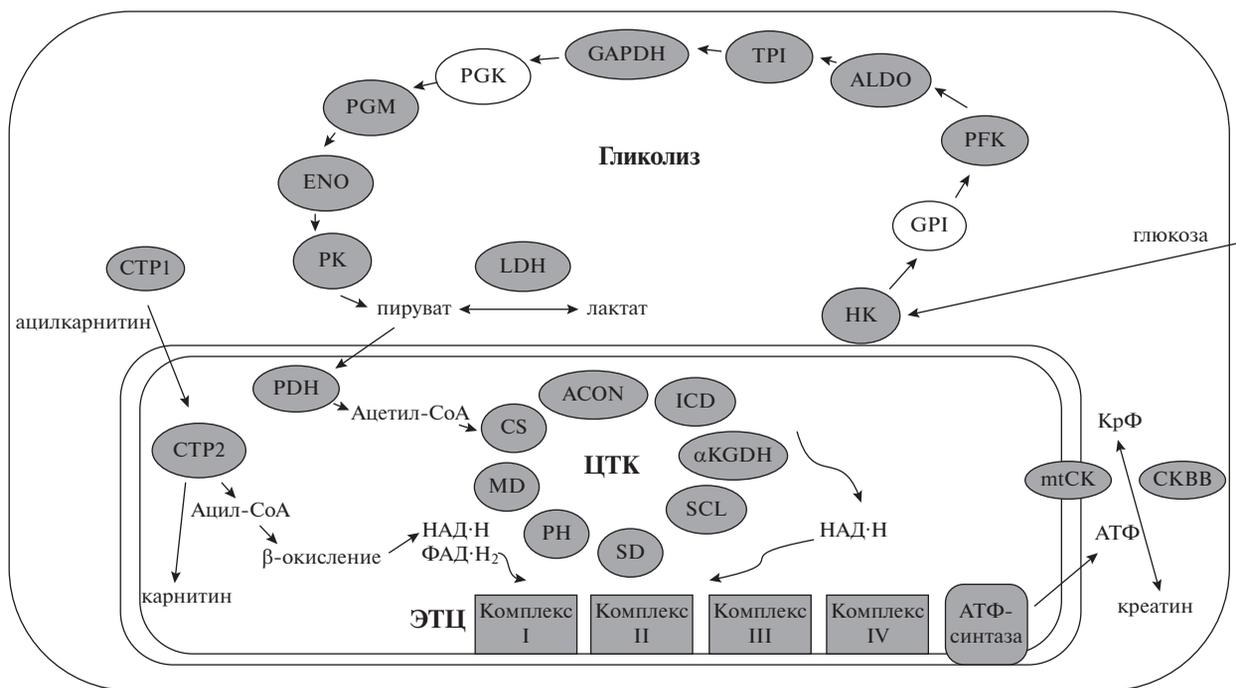
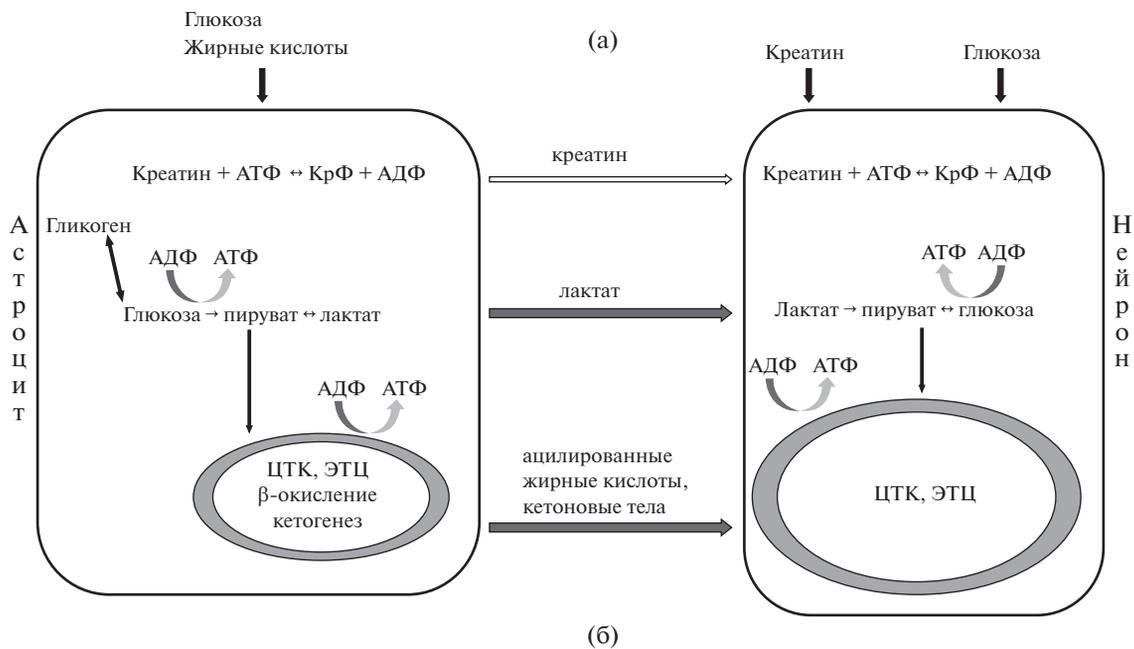
При нормальных физиологических условиях глюкоза служит основным и обязательным энергетическим субстратом в мозге (рис. 1).

В основной оси продукции АТФ в мозге можно выделить вклад: гликолиза, окислительного фосфорилирования, а также β -окисления и метаболизма кетоновых тел [9]. Кроме того, в мозге есть небольшие запасы гликогена, которые преимущественно присутствуют в астроцитах [10], но

Рис. 1. Схема компартиментализации основных процессов энергетического метаболизма в мозге. *а* – Схема взаимодействия между нейронами и глией (астроцитами). *б* – Внутриклеточные энергетические процессы с изображением белков, активность и/или концентрация которых изменены при шизофрении.

(*а*) Глюкоза переносится в клетки белками-переносчиками глюкозы или образуется в результате распада гликогена в астроцитах. В астроцитах глюкоза используется в главной “оси” производства АТФ (гликолиз), для восстановления запасов восстановительных эквивалентов и процессов биосинтеза. В нейронах глюкоза используется для восстановления запасов восстановительных эквивалентов. Конечный продукт гликолиза пируват поступает в цикл трикарбоновых кислот. Большая часть пирувата в астроцитах превращается лактатдегидрогеназой 5 в лактат и транспортируется во внеклеточное пространство и в нейроны (“астроцитарно-нейрональный челнок”). В нейронах лактат снова превращается в пируват, который может участвовать в ЦТК и окислительном фосфорилировании с генерацией трансмембранного протонного градиента и образованием АТФ АТФ-синтазой. Жирные кислоты окисляются в астроцитах с образованием кетоновых тел, которые могут либо служить субстратом для дальнейших реакций в митохондриях астроцитов, либо транспортироваться в нейроны. Обратимая реакция фосфорилирования креатина до креатинфосфата, катализируемая креатинкиназой, служит для временного запасания энергии АТФ в форме креатинфосфата, в основном, в астроцитах, окружающих глутаматные синапсы, где существует потребность быстрого высвобождения АТФ для преобразования захваченного глутамата в глутамин, транспортируемый далее в нейроны.

(*б*) Внутриклеточные энергетические процессы с изображением белков, активность и/или концентрация которых изменены при шизофрении (выделены темным градиентным фоном). Принятые сокращения: КрФ – креатинфосфат, ЦТК – цикл трикарбоновых кислот, ЭТЦ – электронно-транспортная цепь, АСОН – аконитаза, АЛДО – альдолаза, СК ВВ – креатинкиназа ВВ, СС – цитратсинтаза, СТР1 – карнитинпальмитоилтрансфераза 1, СТР2 – карнитинпальмитоилтрансфераза 2, ЕНО – енолаза, FH – фумаратгидратаза, НК – гексокиназа, GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, GPI – глюкозо-6-фосфатизомераза, ICD – изоцитратдегидрогеназа, α KGDH – α -кетоглутаратдегидрогеназа, LDH – лактатдегидрогеназа, MD – малатдегидрогеназа, mtCK – митохондриальная креатинкиназа, PDH – пируватдегидрогеназа, PFK – фосфофруктокиназа, PGK – фосфоглицераткиназа, PGM – фосфоглицераттаза, PK – пируваткиназа, SCL – сукцинат-КоА лигаза, SD – сукцинатдегидрогеназа, ТР1 – триозофосфатизомераза.



также обнаруживаются и в нейронах и могут мобилизоваться при определенных условиях [11]. Важную роль в поддержании концентрации АТФ играет креатинфосфокиназная система [12].

Для компенсации различных потребностей в энергии и повышения эффективности снабжения клеток необходимыми метаболитами в мозге существуют механизмы, обеспечивающие усиление кровотока и утилизацию метаболитов в областях повышенной нервной активности [13]. Источники АТФ динамически меняются в зависи-

мости от активности нейронов. Хотя и нейроны, и астроциты способны поглощать глюкозу и осуществлять как гликолиз, так и цикл Кребса (цикл трикарбоновых кислот, ЦТК), накопленные данные подтверждают гипотезу о том, что “активные” нейроны могут “делегировать” гликолитическую активность астроцитам [14]. Для объяснения механизма этого явления и обеспечения энергетических потребностей нейронов была выдвинута модель “астроцитарно-нейронального лактатного челнока” [15], согласно которой при поглоще-

нии астроцитами глутамата (благодаря глутамат/глутаминовому циклу) [16] происходит увеличение скорости поглощения глюкозы, переключение с окислительного метаболизма на аэробный гликолиз и высвобождение во внеклеточное пространство лактата, который используется нейронами. Эта модель поддерживается многочисленными исследованиями, обнаружившими повышенное содержание лактата в участках мозговой активности и показавшими необходимость лактата для поддержания синаптической активности [13]. В тоже время получены данные, указывающие на то, что при разных метаболических условиях могут реализоваться различные стратегии, касающиеся транспорта энергетических субстратов между астроцитами и нейронами [17, 18]. В настоящее время модель “астроцитарно-нейронального лактатного челнока” рассматривается как один из нескольких способов удовлетворения энергетических потребностей нейронов [18, 19].

Кроме того, исследования Ebert D. et al. показали, что в астроцитах активно осуществляется β -окисление жирных кислот, за счет которого образуется до 20% энергии, расходуемой головным мозгом [20], поэтому в тканях головного и спинного мозга содержатся значительные количества карнитина и ацил-карнитинов.

Нейроны также имеют механизмы обеспечения обратной связи и регуляции потоков энергии и контроля продукции и потребления энергии для поддержания гомеостаза [21–23].

Таким образом, в ЦНС различные нейрональные и не нейрональные источники АТФ работают “по запросу”, в зависимости от локальных уровней синаптической активности.

2. ГЕНОМНЫЕ, ТРАНСКРИПТОМНЫЕ И ПРОТЕОМНЫЕ ДАННЫЕ О НАРУШЕНИЯХ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

2.1. Геномные и транскриптомные исследования.

Многочисленные исследования близнецов, семей с повышенной частотой встречаемости заболевания шизофренией и крупные популяционные исследования шизофрении показали, что шизофрения относится к полигенным заболеваниям, при которых нарушения экспрессии нескольких или многих генов объединяются, формируя общий фенотип заболевания. Генетические локусы, ассоциированные с шизофренией, сходятся на определенных молекулярных кластерах: “постсинаптическая плотность”, “организация цитоскелета” и “митохондрии” [24].

Проводимые с начала XXI века широкомаштабные транскриптомные исследования посредством микроэрегов (микрочипов) аутопсийного материала разных структур мозга больных

шизофренией выявили изменение экспрессии ряда генов, кодирующих белки, связанные с энергетическим метаболизмом, а именно, белки малатно/аспартатного шаттла (малатно/аспартатный шаттл обеспечивает импорт в митохондрии восстановительных эквивалентов НАДН/НАДФН, образующихся в цитоплазме путем гликолиза) и ЦТК [25], белки, связанные с метаболизмом креатинфосфата (КрФ) [25], а также генов, кодирующих митохондриальные белки [26, 27]. Показано, что нарушение работы митохондрий при шизофрении может быть связано с полиморфизмами и перестройками (абберациями) митохондриальных генов и генов ядерного генома, кодирующих митохондриальные белки [24].

Результаты генетических исследований (мультиплексного анализа) шизофрении указали на сцепленность генов, кодирующих гликолитические ферменты фосфофруктокиназу-2/фруктозо-2,6-бисфосфатазу, гексокиназу (НК) и пируваткиназу, с этим заболеванием [28], что также свидетельствует о вкладе биоэнергетических нарушений в патогенез шизофрении.

Транскриптомные исследования обнаружили, что при шизофрении снижена экспрессия гена, кодирующего мембранную субъединицу АТФ-синтазы [29].

2.2. Протеомные исследования. Протеомные исследования мозга и биологических жидкостей больных шизофренией предоставили новые возможности для конкретизации молекулярных процессов, определяющих патогенез шизофрении [30]. При этом даже высказывалось предположение о том, что протеомика может предоставить больше информации о патофизиологии шизофрении, чем геномика и транскриптомика, поскольку протеомика характеризует спектр белков, присутствующих в конкретные моменты времени в ходе развития болезни [31, 32].

При обширном сравнительном анализе данных, полученных в различных протеомных исследованиях образцов аутопсийного мозга больных шизофренией, обнаружено изменение концентрации белков, имеющих отношение к энергетическому метаболизму [5, 32]. Также выявлены отклонения в концентрации белков, имеющих отношение к глюконеогенезу, метаболизму глутамата, окислительному стрессу и сигнальным путям, связанным с энергетическим метаболизмом [5].

2.2.1. Изменения в гликолитическом пути при шизофрении. Уже давно известны и неоднократно подтверждены различными исследователями аномалии метаболизма глюкозы и повышение содержания лактата в спинномозговой жидкости и мозге при шизофрении [33–36], свидетельствующие о нарушении энергетического метаболизма. Далее мы рассмотрим подробнее известные на се-

годняшний день нарушения в основных звеньях энергетического метаболизма, в том числе объясняющие и эти феномены.

При шизофрении выявлены следующие изменения содержания ферментов гликолиза.

Гексокиназа. По-видимому, изменение концентрации этого фермента при шизофрении может различаться в зависимости от структуры мозга. Так, в одном исследовании сообщается о повышенной концентрации НК1 в дорсолатеральной префронтальной коре [37]. При этом в другом исследовании в поле 10 (по Бродману) было обнаружено снижение концентрации НК1 [38]. Возможно также, что различие результатов объяснялось различными способами экстракции белков из образцов ткани мозга, использованными в разных работах. Еще в одном исследовании наблюдали повышение отношения уровня НК1, локализованной в цитоплазматической фракции, к НК1, ассоциированной с митохондриальной фракцией [39]. В норме НК1 связывается с наружной мембраной митохондрий за счет N-концевого домена связывания митохондрий, и это связывание регулирует активность глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы [40]. НК1 взаимодействует также с потенциал-зависимым ионным каналом VDAC [41]. НК1 функционально сопрягает окислительное фосфорилирование с гликолизом в цитоплазме (использует образовавшуюся в результате окислительного фосфорилирования АТФ для фосфорилирования глюкозы), что регулирует скорость метаболизма глюкозы в соответствии с потребностями клетки в энергии и позволяет избежать чрезмерного производства лактата [42]. Диссоциация НК1 от митохондрий может приводить к усилению анаэробного метаболизма глюкозы и увеличению концентрации лактата, что и наблюдается в мозге и спинномозговой жидкости больных шизофренией [42]. Учитывая важность регуляторных свойств НК1, необходимы дополнительные исследования этого фермента при шизофрении.

Альдолаза. В литературе имеются данные о том, что при шизофрении концентрация альдолазы С повышена в поле 46 [43] и снижена в поле 22 [44] и передней поясной коре [45], концентрации альдолазы А и В снижены в поле 10 [38], а в поле 24 концентрация альдолазы А повышена [46].

Триозофосфатизомераза 1. Концентрация ее при шизофрении повышена в поле 22 [44] и таламусе [47].

Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа. Концентрация ее при шизофрении понижена в поле 22 [44] и повышена в дорсолатеральной коре [37] и таламусе [47].

Фосфоглицератмутаза 1. Концентрация фермента при шизофрении повышена в поле 22 [44] и таламусе [47].

Енолаза 2. Концентрация фермента при шизофрении повышена в поле 22 [44], снижена в поле 10 [38] и поле 9 [48].

Фосфофруктокиназа. Концентрация фермента при шизофрении повышена в дорсолатеральной префронтальной коре [37].

Уровень *лактатдегидрогеназы А* снижен при шизофрении в поле 24 [45], *лактатдегидрогеназы В* – в мозолистом теле [49] и гиппокампе [50].

Таким образом, изменения концентрации ряда гликолитических ферментов при шизофрении происходит не единообразно, а специфично для каждой структуры мозга.

Данные нейровизуализации (ЯМР) и метаболического анализа аутопсийного мозга больных шизофренией также свидетельствуют о нарушении регуляции гликолиза и усилении катаболизма гликогена (из-за повышенной потребности в глюкозе), увеличении концентрации лактата и снижении внутриклеточного рН (рН_i), что указывает на переход от аэробного дыхания к анаэробному гликолизу [51]. Интересно, что повышение уровня лактата в мозге у больных шизофренией прямо коррелирует со снижением когнитивных функций и функциональной несостоятельностью (проблемами социального функционирования) [35].

2.2.2. Нарушения митохондриального энергетического метаболизма

2.2.2.1. Роль митохондрий в обеспечении нейронных функций в норме и митохондриальных нарушениях при шизофрении. Митохондрии играют решающую роль в энергетическом обеспечении и регуляции клеточных функций, включая биоэнергетику, гомеостаз кальция, передачу редокс-сигналов и гибель клеток путем апоптоза. Митохондрии также необходимы для многих аспектов развития нервной системы и функционирования нейронов. Нарушение митохондриальной функции, приводящее к нарушению энергетического состояния клеток, влечет аномалии развития нервной системы из-за воздействия на дифференцировку клеток, образование связей между нейронами, нейромедиаторные системы и миелинизацию, что имеет место при шизофрении [52, 53].

Известно, что митохондрии могут модулировать активность нейронов, морфогенез и пластичность шипиков и синапсов [54]. В экспериментальных моделях на животных показано, что факторы, связанные с делением и слиянием митохондрий, необходимы для эмбрионального развития и образования синапсов [55, 56], а дефекты в этих процессах приводят к аномальному развитию нейронов. Нарушения дифференцировки нейронов, возникающие вследствие митохондриальной дисфункции, были моделированы в инду-

цированных плюрипотентных стволовых клетках волосяных фолликул пациентов с шизофренией [57].

Принято считать, что шизофрения – это нейроонтогенетическое заболевание, т.е. в ее основе лежат аномалии развития нервной системы. Перечисленные выше наблюдения указывают на возможный вклад дополнительного патогенетического фактора – участия митохондриальных нарушений в аномалиях развития нервной системы при шизофрении [58].

Интересно, что при экспериментальном моделировании нарушения работы нейромедиаторной глутаматной системы наблюдается развитие митохондриальной дисфункции. Так, при экспериментальном моделировании шизофрении на животных посредством воздействия кетамином (антагонистом глутаматных рецепторов NMDA-типа, симулирующим глутаматергическую “гипофункцию”, имеющую место при шизофрении, и аномальное поведение, напоминающее психоз), у животных развивались митохондриальная дисфункция и поведенческие изменения, что тоже подтверждает связь митохондриальной патологии с патогенезом шизофрении [59].

Некоторые исследователи полагают, что молекулярные изменения, приводящие к митохондриальной дисфункции, – не дополнительный, а ключевой патогенетический фактор шизофрении [60, 61]. Повышенная частота психических отклонений при митохондриальных заболеваниях, вызванных мутациями в митохондриальных генах, указывает на важность митохондриального генома для риска развития психических расстройств, включая шизофрению [62, 63]. У больных с митохондриальными заболеваниями часто описываются когнитивные нарушения, депрессивные симптомы и нарушения поведения, такие как абстиненция, социальные проблемы, дефицит внимания, нарушения сна и эмоционального реагирования у детей. Реже галлюцинации, симптомы шизофрении и шизофреноподобных состояний [64, 65].

2.2.2.2. Изменения при шизофрении активности ферментов ЦТК. Митохондриальные нарушения в мозге больных шизофренией различаются в зависимости от структуры мозга и типа клеток. Данные протеомных исследований мозга больных шизофренией свидетельствуют об изменении как концентрации митохондриальных белков и ферментов, так и активности митохондриальных ферментов.

Так, показано, что в поле 9 и полосатом теле снижена концентрация пируватдегидрогеназы [38, 66], с чем, возможно, связано повышенное содержание пирувата и лактата в этих областях мозга. Обнаружено снижение концентрации ферментов аконитазы и малатдегидрогеназы в поле 10 [38, 43], цитратсинтазы в поле 24 [67] и повы-

шение содержания малатдегидрогеназы в таламусе [47].

В работе Bubber P. показано, что в поле 46 изменена активность ферментов ЦТК: снижена активность пируватдегидрогеназы, цитратсинтазы, а также аконитазы, изоцитратдегидрогеназы, альфа-кетоглутаратдегидрогеназы, сукцинаттиокиназы и повышена активность сукцинатдегидрогеназы, фумаразы и малатдегидрогеназы [68].

2.2.2.3. Нарушения дыхательной электронно-транспортной цепи митохондрий при шизофрении. Митохондриальная электронно-транспортная цепь (ЭТЦ) – сложный мультиферментный комплекс, состоящий из белков-переносчиков электронов, условно объединенных в комплексы I–IV.

Комплекс I. Еще в начале этого века было проведено подробное сравнительное исследование комплексов I–IV ЭТЦ в аутопсийных образцах мозга пациентов с шизофренией и контрольной группы. Критически сниженная активность НАДН-дегидрогеназного комплекса (комплекса I – крупнейшего белкового комплекса дыхательной цепи, через который электроны транспортируются в систему окислительного фосфорилирования), наблюдалась в образцах базальных ганглиев и височной коры больных шизофренией [69]. В тех же структурах у больных обнаружено снижение активности комплекса III, в то время как активность комплекса IV была снижена в лобной и височной коре [69].

Более того, в поле 10 и полосатом теле при шизофрении было обнаружено снижение экспрессии мРНК и количества субъединиц комплекса I [38, 70, 71]. Было высказано предположение, что aberrантная динамика митохондриальной сети, включая слияние и деление митохондрий, также может иметь отношение к аномалиям комплекса I у пациентов с шизофренией [72], поскольку, как известно, аномалии комплекса I могут нарушать клеточное дыхание и динамику митохондриальной сети, индуцировать усиление генерации активных форм кислорода и активацию апоптоза [73].

Комплекс III. В протеомных исследованиях аутопсийного мозга при шизофрении выявлено изменение концентрации корового белка комплекса цитохром *bc1* (убихинол-цитохром *c*-оксидоредуктаза, комплекса III) [38, 43]. Коровый белок комплекса цитохром *bc1* локализован в митохондриальном матриксе, а весь этот комплекс – ключевой компонент ЭТЦ, интегральный компонент внутренней митохондриальной мембраны.

Комплекс IV. Активность комплекса IV (цитохром *c*-оксидаза, ЦО) и концентрация белковых ключевых субъединиц комплекса IV были оценены в аутопсийном мозге больных шизофренией и лиц без психической патологии. Хотя общая активность ЦО в контроле и у больных не различалась, при шизофрении наблюдалось снижение

концентрации отдельных субъединиц ЦО [74, 75]. В некоторых исследованиях отмечалось снижение активности ЦО [76, 77]. В фармакологических моделях на животных, в течение длительного времени получавших антипсихотические препараты, не было обнаружено каких-либо изменений в концентрации субъединиц ЦО, что позволяет предположить, что изменения, наблюдаемые при шизофрении, не были вызваны лекарственными препаратами [78].

2.2.2.4. Исследования митохондриальной ЭТЦ в клетках крови. Изменения концентраций и активности дыхательных ферментов, обнаруженные в митохондриях мозга больных шизофренией, могут обнаруживаться в митохондриях клеток крови. Многие авторы ранних работ регистрировали в тромбоцитах больных с шизофренией изменение активности митохондриального комплекса I относительно контрольных значений [79, 80]. Выявленные при шизофрении изменения ферментативной активности комплекса I в митохондриях тромбоцитов в значительной степени зависели от состояния больных [80, 81]. Так, в клетках периферической крови у пациентов с шизофренией в острой стадии (как получающих медикаментозное лечение, так и не получающих) активность комплекса I была повышена, в то время как она была снижена у получающих лечение пациентов с хроническим течением шизофрении и с наличием резидуальных симптомов [80].

В наших работах при сравнении с контрольными значениями мы обнаружили достоверное снижение активности тромбоцитарной ЦО как у больных с первым приступом шизофрении до начала лечения (*U*-тест Манна–Уитни, $p < 0.001$) [81], так и у больных с хронически протекающей параноидной шизофренией в стадии обострения ($p = 0.000001$) [82]. Однако в группе пациентов при первых юношеских депрессиях с аттенуированными симптомами шизофрении и высоким риском развития психоза различий в активности тромбоцитарной ЦО по сравнению с контрольной группой не зарегистрировано [83, 84]. Возможно, снижение активности тромбоцитарной ЦО происходит лишь при развитии психоза или обострении заболевания с хроническим течением. Интерпретировать результаты, полученные при изучении энергетического метаболизма (митохондрий) на клетках периферической крови, нужно с пониманием того, что мутации генов митохондриальной ДНК (как и генов ядерного генома) могут происходить лишь в отдельных тканях и органах, что приводит к мозаичности [85].

2.2.2.5. Нарушение энергетического звена АТФ-синтазы при шизофрении. Как упоминалось выше, в недавних транскриптомных [29] и протеомных исследованиях [5] при шизофрении обнаружено изменение экспрессии гена и концентрации

белка, являющегося субъединицей АТФ-синтазы. АТФ-синтаза отвечает за превращение АДФ в АТФ за счет трансмембранного градиента концентрации протонов, формируемого переносчиками дыхательной митохондриальной цепи (реакции окислительного фосфорилирования).

2.2.2.6. β -окисление и транспорт карнитина и жирных кислот в митохондриях. При исследовании образцов аутопсийного мозга больных шизофренией (поле 9) были обнаружены изменения, касающиеся ферментов, участвующих в β -окислении, и ферментов транспортной системы карнитина [38]. Так, количество транскриптов карнитинпальмитоилтрансферазы 1, осуществляющей перенос ацильной группы от молекулы ацил-СоА на карнитин, и карнитинпальмитоилтрансферазы 2, расщепляющей ацилкарнитина на карнитин и ацил-СоА, на внешней и внутренней митохондриальных мембранах было значительно повышено в мозге больных шизофренией. Инициация и регуляция β -окисления внутри митохондрий и пероксисом связана с активностью карнитилацетилтрансферазы [86], содержание которой при шизофрении также было значительно повышено на уровне транскриптов.

2.3. Система макроэнергетических соединений креатинфосфат/АТФ. Уровень АТФ в мозге контролируется ферментативными реакциями, катализируемыми АТФ-азой и креатинфосфокиназой (КК). При резком повышении энергетических потребностей КК использует КрФ для быстрого фосфорилирования АДФ до АТФ [12]. Преобразование креатина в КрФ посредством КК действует как биоэнергетический датчик, поддерживающий стабильные уровни АТФ при значительных потребностях энергии в клетке.

Методом ^{31}P -ЯМР, позволяющей определять уровень высокоэнергетических фосфатов, было обнаружено снижение концентрации АТФ и КрФ в префронтальной коре мозга пациентов с шизофренией [87], а также у пациентов с шизофренией и их родственников первой степени [88]. В одной из ранних работ было показано, что тяжесть негативных симптомов и нейропсихологические показатели коррелируют с уровнями АТФ и КрФ [89]. Несмотря на наличие нескольких исследований, результаты которых единообразны в том, что в мозге пациентов с психозами по сравнению со здоровыми субъектами происходит изменение уровней КрФ и АТФ, в недавнем обзоре доступной литературы [90] подчеркивается, что имеющиеся данные сильно варьируют и неоднозначны с точки зрения интерпретации метаболических изменений.

Изменение уровня КрФ при шизофрении может быть связано с изменением концентрации мозговой изоформы КК (КК ВВ). Протеомные исследования разных структур аутопсийного мозга

показали как повышение, так и снижение уровня КК ВВ [49, 67, 91]. В наших работах было обнаружено сильное и достоверное снижение креатинкиназной активности и количества мозговой цитоплазматической формы КК ВВ во фракции легко растворимых белков, экстрагированных из аутопсийных образцов полей 10, 23, 24, гиппокампа и коры мозжечка больных шизофренией при сравнении с контролем [92, 93]. Эти данные согласуются с результатами, полученными группой американских исследователей, измеривших скорость реакции КК в лобной коре мозга пациентов с шизофренией *in vivo* с использованием техники переноса намагничивания в сочетании с ³¹P-ЯМР и обнаруживших ее значительное снижение относительно контроля [94]. Позднее той же группой специалистов тем же методом был количественно определен поток метаболитов через реакцию КК (“поток КК”) и было показано его снижение в медиальной префронтальной коре больных шизофренией по сравнению с контролем [95]. В другом исследовании той же группы ученых тем же методом в лобной коре больных с первым эпизодом психоза показано достоверное снижение (на 15%) константы скорости реакции КК, снижение (на 12%) “потока КК” (тенденция, не достоверно), тогда как достоверных изменений в уровнях КрФ и АТФ не обнаружено [90].

Кроме цитоплазматических форм КК, существуют митохондриальные формы КК (мтКК). мтКК локализована на наружной митохондриальной мембране и представлена двумя формами — саркомерной (s-мтКК) и повсеместно распространенной (u-мтКК) [12]. мтКК играет важную роль в процессе энергетического метаболизма митохондрий, однако, если цитоплазматической форме КК ВВ при шизофрении посвящен ряд цитированных выше работ, то исследования мтКК при шизофрении практически отсутствуют. Так, проведенный Clark et al протеомный анализ поля 24 мозга больных шизофренией не показал наличия u-мтКК [67]. Что касается исследований мтКК при других патологиях нервной системы, то опубликована единственная работа [96], в которой активность u-мтКК и s-мтКК определяли с использованием метода иммуноингибирования в сыворотке 50 больных болезнью Паркинсона и контрольной группы, и у больных было выявлено достоверное и значительное снижение активности u-мтКК, но не s-мтКК. При этом у больных наблюдалась достоверная корреляция между активностью u-мтКК и скоростью прогрессирования заболевания, продолжительностью и возрастом начала заболевания. Мы считаем, было бы интересно исследовать мтКК при шизофрении.

Многочисленные исследования в конце прошлого—начале нынешнего века показали, что в крови пациентов с психозами, в том числе при шизофрении, определяются высокие уровни ак-

тивности сывороточной КК, которая, в основном, представлена изоформой КК ММ, преобладающей в скелетной мускулатуре [97–99]. При этом уровни сывороточной КК у больных с шизоаффективным расстройством выше, чем у больных шизофренией [99] и коррелируют с показателями по шкале оценки позитивных и негативных синдромов (PANSS), а проведенный в Китае ретроспективный анализ сывороточной КК у 2780 больных шизофренией показал ее достоверную связь с уровнем агрессии больных [100].

3. ВОЗМОЖНОСТИ ТЕРАПИИ, НАПРАВЛЕННОЙ НА КОРРЕКЦИЮ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

Таким образом, у больного шизофренией могут оказаться нарушенными различные звенья энергетического метаболизма. Существующие на сегодняшний день методы инструментальных и биохимических исследований митохондриальных нарушений [101] не могут дать ответ на вопрос, какую долю составляют такие больные среди всех пациентов с шизофренией и какие именно биохимические процессы должны и могут быть подвергнуты коррекции для улучшения клинического состояния пациентов.

Митохондриальная дисфункция рассматривается как одно из основных звеньев нарушений при шизофрении. Поэтому в качестве препаратов дополнительной терапии часто испытывают энерготропные препараты, которые применяются для лечения митохондриальных заболеваний, витамины и антиоксиданты [102]. В таких испытаниях прежде всего оцениваются изменения выраженности негативных симптомов, астении и специфических для шизофрении когнитивных нарушений, которые логически (и часто гипотетически) выводятся из “недостаточности” митохондриальной функции и энергетического метаболизма в целом.

3.1. Препараты, влияющие на доступность субстратов ЭТЦ

L-карнитин и его производные. Карнитин (три-метиламино-β-диоксипутират) присутствует в клетках в виде свободного карнитина и ацилкарнитинов. Он играет важную роль в метаболизме липидов и митохондриальном β-окислении жирных кислот, регулирует соотношение пула свободного кофермента А и ацил-кофермента А и удаление избытка ацильных групп. В литературе обсуждаются антиоксидантные свойства карнитина и его способность предотвращать апоптоз клеток [103]. Кроме того, производные карнитина играют роль в окислении глюкозы и могут повышать инсулиновую резистентность [104].

L-карнитин и его ацилированные и ацетилированные производные при шизофрении представляют интерес с диагностической точки зрения [105, 106].

Что же касается терапии, то препараты с L-карнитином и ацетил-L-карнитином применяются в лечении астении [107], которой часто страдают больные шизофренией. Интерес к ацетил-L-карнитину обусловлен еще и тем, что он является модулятором активности глутаматной системы [108]. 12-недельное открытое неконтролируемое клиническое испытание, направленное на выяснение эффективности ацетил-L-карнитина в отношении клинических симптомов и когнитивных функций у пациентов, частично отвечающих на терапию клозапином, показало, что дополнительное лечение ацетил-L-карнитином усиливает (аугментирует) действие клозапина в отношении позитивных симптомов и неэффективно в отношении негативной симптоматики и когнитивных нарушений [109]. Другое контролируемое клиническое испытание эффективности ацетил-L-карнитина в качестве дополнительной терапии к оланзапину в отношении негативных симптомов и когнитивных нарушений также не показало существенных различий в отношении улучшения негативной симптоматики и тяжести когнитивных нарушений между группами больных, участвующих в испытании [110]. Отечественных исследований по эффективности L-карнитина и его производных при шизофрении не опубликовано.

3.2. Препараты, влияющие на перенос электронов по ЭТЦ

Кофермент Q10. Кофермент Q10 является компонентом митохондриальной ЭТЦ, участвующим в переносе электронов от комплексов I и II на комплекс III и синтезе АТФ. При применении кофермента Q10 указывается на важность дифференциации состояния первичного дефицита кофермента Q10, которое поддается коррекции при введении добавки к пище.

Результаты рандомизированного плацебо-контролируемого испытания эффективности кофермента Q10 в отношении когнитивных функций и симптомов шизофрении и шизоаффективного расстройства показали некоторые улучшения состояния больных шизофренией в отношении общей утомляемости, когнитивных функций и аффективных нарушений. Было высказано предположение о том, что кофермент Q10 можно применить в терапии шизофрении [111]. Однако, в опубликованном позднее отчете о проведенном клиническом испытании сообщалось об отсутствии положительного эффекта препарата в отношении исхода лечения, хотя и было отмечено повышение уровня кофермента Q10 в плазме через 3 мес. лечения, но по прошествии полугода

это повышение стало статистически незначимым в сравнении с плацебо [112].

Идебенон. Синтетический аналог коэнзима Q10 активизирует синтез глюкозы и АТФ, способствует выведению лактата. Замедляет перекисное окисление липидов и предохраняет мембраны нейронов и митохондрий от повреждений. Модулирует нейрофизиологические реакции мозговых структур. Опубликовано единственное японское исследование с описанием опыта эффективного применения идебенона [113] вместо антипсихотической терапии (при неэффективности и побочных эффектах последней). Опубликованных результатов контролируемых клинических испытаний не найдено.

3.3. Препараты, снижающие концентрации токсических метаболитов

Другой подход к коррекции энергетического метаболизма включает снижение концентрации токсических метаболитов, в том числе активных форм кислорода и перекисей, посредством соединений, проявляющих антиоксидантную активность, таким как альфа-липоевая кислота (АЛК), N-ацетилцистеин (НАС) [114, 115], этилметилгидроксипиридина сукцинат, ресвератрол.

Альфа-липоевая кислота. АЛК является коферментом, участвующим в окислительном декарбоксилировании альфа-кетокислот, таких как пируват и альфа-кетоглутарат, и играет существенную роль в процессе образования энергии в организме. АЛК — сильный антиоксидант. Она также активизирует деятельность других антиоксидантов — витаминов А, С, глутатиона и коэнзима Q10 [116].

АЛК обладает способностью обращать гипofункцию глутаматных рецепторов NMDA-типа и блокировать дофаминовые рецепторы. Предполагалось, что сочетание таких свойств может оказаться благоприятным и применяться в лечении шизофрении, устойчивой к терапии конвенционными препаратами. Действительно, известен положительный опыт применения АЛК в таких клинических случаях [117]. Исследование эффективности АЛК как дополнительного лекарственного агента в отношении позитивных и негативных симптомов, когнитивных нарушений и побочного действия при шизофрении, устойчивой к действию препаратов, показало более выраженное улучшение по сумме баллов шкалы негативных расстройств, в подгруппе пациентов, получавших АЛК. Также наблюдалось снижение показателей окислительного стресса.

В то же время в контролируемом клиническом испытании АЛК в качестве дополнительной терапии при шизофрении не было обнаружено значительного улучшения когнитивных функций, психопатологических показателей, побочных эф-

фактов нейролептиков или показателей окислительного стресса и воспаления в экспериментальной группе по сравнению с плацебо. В группе больных, получавших АЛК, отмечалось значительное снижение количества эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов [118].

N-ацетилцистеин. Благодаря тому, что НАС проявляет антиоксидантную активность и способен модулировать активность глутаматной системы, уменьшать действие окислительного стресса на митохондрии и восстанавливать недостаточность митохондриальной активности, НАС перспективен с точки зрения его применения при шизофрении для коррекции энергетического метаболизма [114, 119].

При применении НАС при шизофрении был обнаружен статистически значимый эффект, выражающийся в улучшении характеристик рабочей памяти [115, 120], а также отмечено достоверное снижение баллов по шкалам, оценивающим позитивную, негативную симптоматику и общую психопатологию, причем по сравнению с группой плацебо достоверно отличалась динамика негативных симптомов и общей психопатологии. Таким образом, НАС оказывает положительное влияние на выраженность негативных симптомов и других психопатологических проявлений шизофрении, а также улучшает когнитивное функционирование больных [114].

Этилметилгидроксипиридина сукцинат (мексидол). Отечественный оригинальный препарат мексидол имеет широкий спектр действия. Он обладает антиоксидантным и антигипоксическим эффектами, оказывает влияние на физико-химические свойства мембран, способен улучшать энергетический статус клетки и восстанавливать процессы в ЦТК, индуцировать митохондриогенез и уменьшать глутаматную эксайтотоксичность [121, 122].

Применение мексидола в качестве дополнительной терапии при лечении параноидной шизофрении показало, что оно обеспечивает более быстрое и полное купирование психопатологических симптомов по сравнению с традиционной терапией нейролептиками у определенных групп больных [123, 124]. В психиатрической практике мексидол, в основном, применяется для коррекции побочного действия нейролептиков [125].

Ресвератрол. Ресвератрол – природный полифенол, обладающий широким спектром действия. Ресвератрол известен как антиоксидант, нейропротектор, противовоспалительное, антиапоптотическое и противоопухолевое соединение. Разнообразие биологических эффектов ресвератрола обусловлено большим количеством молекулярных мишеней [126].

Подобно сукцинату этилметилгидроксипиридина, ресвератрол (200 мг/день) был успешно

применен при шизофрении как дополнительное терапевтическое средство к антипсихотику рисперидону в плане улучшения переносимости основной терапии и снижения побочного действия нейролептика, причем в одном исследовании сообщалось и об улучшении на фоне ресвератрола негативных симптомов и общей психопатологии, оцененных по психометрическим шкалам [127]. С другой стороны, опубликованы результаты исследований, в которых не было найдено значимых преимуществ в улучшении психического состояния пациентов и когнитивных функций от применения ресвератрола [126, 128, 129].

Кофеин. Потребление кофеина больными шизофренией (в среднем 500 мг/день) почти втрое превышает среднее его потребление в общей популяции, причем в одном исследовании показано, что треть пациентов вне стационаров потребляют его более 550 мг/день [130]. Несмотря на давность этих наблюдений, влияние усиленного потребления кофеина на симптоматику и когнитивные функции до сих пор изучено недостаточно [131, 132].

В недавнем исследовании, посвященном вопросу потребления кофеина больными шизофренией и шизоаффективным расстройством и его влияния на состояние больных и их когнитивные способности [133], выяснено, что у 13 пациентов, которые потребляли умеренные дозы кофеина (≤ 250 мг/день), по сравнению с 14 пациентами, потребляющими высокие (> 250 мг/день) дозы, оказались выше способности решения задач и прохождения тестов на исполнительные функции. У пациентов, потребляющих высокие дозы кофеина, были менее выражены негативные симптомы, но у них сильнее проявлялась позитивная симптоматика. Хотя группы достоверно различались по количеству выкуренных сигарет, никотиновая зависимость не влияла на результат исследования.

Влияние кофеина на мозг и его функционирование в норме (сон, когнитивные функции, память, обучение) и при патологиях (включая шизофрению) нейрохимически объясняется его антагонизмом к аденозиновым рецепторам A1, A2A, A3, and A2B [134]. Кроме того, ксантины, включая кофеин, проявляют и другие нейрохимические эффекты: ингибируют фосфодиэстеразы 1, 4 и 5, усиливают высвобождение кальция из внутриклеточных пулов, взаимодействуют с рецепторами ГАМК-А. В контексте настоящего обзора еще одним важным эффектом кофеина является стимуляция экспрессии генов, кодирующих субъединицы ЦО и, таким образом, усиление ее ферментативной активности [135]. Последний факт важен, если учесть, что при шизофрении обнаружено снижение активности ЦО в мозге [76] и тромбоцитах крови [81, 82].

3.4. Препараты, повышающие запасы АТФ в мозге

Креатин. Еще один подход в коррекции митохондриальной дисфункции направлен на коррекцию недостаточности такого звена энергетического метаболизма, как система КрФ/АТФ. Как отмечалось выше, эта система служит для поддержания уровней АТФ в мозге, и ее компоненты локализованы как в цитоплазме, так и в митохондриальной мембране. Подход предполагает использование соединений, увеличивающих запасы АТФ, например, креатина. При пероральном приеме креатина в мозге увеличивается содержание креатина и КрФ [136]. Известен положительный эффект применения креатина (как пищевой добавки) на когнитивные процессы и функционирование мозга при восстановлении после травмы, депривации сна при депрессии, ишемии, митохондриальных нарушениях, снижении когнитивных функций при старении и старческих деменциях [137, 138]. Поэтому было высказано предположение о возможном использовании креатина в качестве терапевтического средства для изменения метаболизма высокоэнергетических фосфатов в головном мозге больных шизофренией [137].

Клиническое испытание креатина на 7 больных шизофренией с выраженной негативной симптоматикой, резистентной к антипсихотической терапии, показало, что на фоне приема креатина умеренно улучшилось состояние больных, измеренное по подшкале общей психопатологии PANSS. Улучшений со стороны негативной, позитивной симптоматики и когнитивного функционирования отмечено не было [139]. Креатин также облегчал симптомы тардивной (поздней) дискинезии. Также известно двойное слепое плацебо-контролируемое исследование эффективности применения креатина в качестве добавки при лечении шизофрении [140]. Хотя в целом положительного эффекта применения креатина отмечено не было, авторы предложили продолжать и развивать исследования с тем, чтобы выявить подгруппу больных, для которых добавка креатина может оказаться терапевтически ценной. Отсутствие эффекта у больных от приема креатина может объясняться гетерогенностью заболевания и, соответственно, различиями биохимических характеристик пациентов, включенных в исследование без предварительной стратификации.

3.5. Терапия, направленная на изменение уровня окисления жирных кислот

Кетогенная диета. Метаболомную оценку интенсивности метаболизма жирных кислот и степень ее нарушений при шизофрении предлагается проводить по спектру метаболических маркеров — сывороточных концентраций глицериновой кислоты, бета-оксибутират, пируват и цистин [141].

Нам не удалось найти публикаций, в которых этот метод был бы применен, но, возможно, в будущем определение спектра данных биомаркеров позволит стратифицировать пациентов перед назначением кетогенной диеты (КД). КД, содержащая высокое количество жиров и минимальное количество углеводов, предполагает, что в качестве источника энергии используются образующиеся при распаде жиров кетонные тела, такие как бета-оксибутират (БОБ) и ацетат. Показано, что повышенный уровень БОБ может улучшать симптомы неврологических заболеваний [142]. КД может способствовать нормализации окислительно-восстановительных процессов и препятствовать развитию окислительного стресса [142], а БОБ может функционировать не только как энергетический метаболический субстрат, но и как сигнальная молекула в мозге, поэтому посредством него предполагается влиять на патологические процессы, связанные с развитием заболеваний, включая шизофрению.

КД рекомендована при лечении эпилепсии, и в данном случае механизм терапевтического действия КД связан с ингибированием сигнального пути mTOR и влиянием на соотношение активности ГАМК- и глутаматергической систем [143, 144].

Связь между эпилепсией и шизофренией, относящимися к группе нейроонтогенетических заболеваний, хорошо прослеживается, и эффективность некоторых противоэпилептических средств у больных шизофренией подразумевает, что патогенез этих заболеваний имеет сходные черты [142, 145], поэтому можно ожидать, что КД окажется полезной и при лечении шизофрении.

Примерами клинического применения КД при шизофрении являются недавние исследования [146, 147] и публикация почти 60-летней давности [148].

Клинические исследования КД при шизофрении малочисленны и проведены на ограниченных группах больных или описывают истории болезни отдельных пациентов. Однако у отдельных пациентов с хроническим длительным течением шизофрении при лечении КД наблюдалось существенное улучшение состояния и достоверное стабильное облегчение симптоматики в течение продолжительного времени [149, 150]. КД также успешно применена при лечении 2 больных с шизоаффективным расстройством [151]. Недавний ретроспективный анализ подтвердил положительные результаты, полученные при применении КД у 10 больных с шизоаффективным расстройством [152]: отмечено статистически значимое улучшение позитивных и негативных симптомов, снижение дозы антипсихотика у 6 из 10 пациентов к моменту выписки и достоверное улучшение общего состояния больных.

Относительно применения КД для коррекции энергетического метаболизма при шизофрении не сложилось единого мнения – встречаются как критически-пессимистические обзоры этого направления [153], так и выдвигаются интересные предположения о возможных перспективах развития направления КД [154, 155], что, вероятно, резонно, если учитывать гетерогенность заболевания и состояния больных, а также проводить предварительную стратификацию пациентов.

Эффект КД можно симулировать введением БОБ. Однако в ранних сообщениях о применении БОБ при шизофрении сообщалось об отсутствии эффекта, дополнительного к действию антипсихотика [156], что предположительно было связано с неправильно рассчитанной дозой препарата и отсутствием стратификации пациентов перед включением в испытание.

Действительно, оценка уровней БОБ в сыворотке крови 54 больных шизофренией [157] показала, что уровни БОБ у больных достоверно превышают значения в контрольной группе, и это, по мнению авторов, указывает на более высокие потребности в использовании энергии у больных, при этом в концентрации пирувата различий между группами больных и контроля не наблюдалось. Хотя ни концентрации БОБ, ни пирувата не были связаны с клиническими характеристиками заболевания, авторы предполагают, что сывороточные уровни БОБ потенциально могут служить показателем нарушения потребления энергии при шизофрении. Интересно, что выявлена прямая корреляция Пирсона между изменениями уровня БОБ и изменениями исполнительных функций пациентов за период наблюдения 12 нед. С другой стороны, в систематическом обзоре метаболических исследований психозов [158] приведены данные определения концентрации БОБ в сыворотке крови [159] и моче больных шизофренией [141], причем по сравнению с контролем в крови было обнаружено снижение уровня БОБ, тогда как в моче уровень БОБ оказался повышен. Вследствие расхождений в оценках уровней БОБ при шизофрении по сравнению с контролем очевидна необходимость дальнейших исследований, направленных на выявление подгрупп больных шизофренией, в которых отклонения от контроля уровней БОБ могут оказаться разнонаправленными.

Милдронат и реамберин. Милдронат (3-(2,2,2-триметилгидразиний) пропионата дигидрат) – конкурентный ингибитор фермента синтеза карнитина гамма-бутиробетаингидроксилазы, который улучшает метаболизм головного мозга, мозговой кровотока и микроциркуляцию, повышает физическую и умственную работоспособность. Милдронат классифицируется как частичный ингибитор окисления жирных кислот. В отсутствие

карнитина жирные кислоты не могут транспортироваться в митохондрии и, следовательно, не могут выступать в качестве источника энергии. Милдронат также увеличивает относительную метаболическую скорость окисления глюкозы, процесса, требующего меньшее количество кислорода по сравнению с окислением жирных кислот.

Реамберин (N-метилглюкамина натрия сукцинат) препарат с дезинтоксикационным, антигипоксическим и антиоксидантным действием. Главный фармакологический эффект реамберина обусловлен наличием в его составе 1.5% соли сукцината натрия, усиливающей компенсаторную активацию аэробного гликолиза и активирующий метаболические процессы в ЦТК, что приводит к увеличению содержания макроэргических соединений – АТФ и КрФ.

Опубликованы положительные результаты применения милдроната и реамберина в качестве дополнительной терапии у больных параноидной шизофренией с терапевтической резистентностью [160]. В данном исследовании были определены основные биохимические показатели активности энергетического метаболизма больных: концентрации АТФ, АДФ и АМФ, активность и соотношение изоформ лактатдегидрогеназы в эритроцитах до и после курса лечения. У 60 больных, включенных в исследование, содержание АТФ в эритроцитах выросло по отношению к исходному уровню в среднем в 1.95 раза и достигло нижней границы нормы, а содержание АДФ и АМФ, напротив, снизилось до верхней границы нормы. Авторы сделали вывод о том, что включение комбинации реамберина с милдронатом в лечебный комплекс при шизофрении с наличием терапевтической резистентности к нейролептикам способствует повышению эффективности аэробного гликолиза и стимуляции вследствие этого продукции АТФ, что сопровождается восстановлением энергетического потенциала организма.

Итак, какой можно сделать вывод о возможности корректировки митохондриальных нарушений при шизофрении? Исследования малочисленны, и, как правило, проводились на небольших группах больных. Большинство препаратов хорошо переносились, но из-за ограниченного количества доклинических данных и отсутствия надежных результатов клинических испытаний сложно делать вывод об эффективности, потенциальной токсичности и оптимальных дозах используемых добавок у пациентов с шизофренией. В опубликованных в 2022 г. зарубежных клинических рекомендациях для лечения шизофрении рекомендовано использование в качестве дополнительной терапии при шизофрении НАС, метилфолата и экстракта гинкго билоба [161].

В большинстве проведенных испытаний отсутствуют положительные результаты лечения, что, возможно, связано с отсутствием верифицированных биологических показателей, которые можно использовать для определения мишени терапевтического воздействия и назначения соответствующей дополнительной терапии, а также для выделения групп больных, для которых определенная терапия была бы наиболее эффективна. Нам не удалось найти опубликованные исследования, в которых проводилась бы стратификация пациентов и предварительный поиск специфических нарушений какого-либо звена энергетического метаболизма перед проведением клинических испытаний, но в некоторых работах отслеживалась концентрация лекарственного соединения, которым лечили пациентов, и некоторые показатели интенсивности энергетического метаболизма.

4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытые в недавних нейрохимических, транскриптомных и протеомных исследованиях изменения экспрессии генов и концентрации ферментов при шизофрении означают изменения активности в основных звеньях главной метаболической оси генерации АТФ, а также затрагивают окислительное фосфорилирование. Кроме того, при шизофрении обнаружены нейрохимические изменения в мозге, свидетельствующие о нарушении не только продукции АТФ, но и различных других звеньев энергетического метаболизма с вовлечением митохондриальной дисфункции, что влечет за собой окислительные повреждения и приводит к нарушениям синаптической проводимости и аномалиям в функционировании не только нейронных сетей, но и глии, в том числе, олигодендроглии и нарушениям процесса миелинизации. Эти молекулярные изменения приводят к структурным аномалиям и в целом нарушению развития мозга и возникновению психотических симптомов и когнитивных нарушений при шизофрении.

В связи с этим коррекция энергетического метаболизма, в том числе применение митохондриальных модуляторов и митопротекторов, может представлять собой довольно перспективный патогенетически-направленный подход к терапии шизофрении.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pankevich D.E., Altevogt B.M., Dunlop J., Gage F.H., Hyman S.E. // *Neuron*. 2014. V. 84. № 3. P. 546–553.
2. Thomas E.H.X., Bozaoglu K., Rossell S.L., Gurvich C. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2017. V. 77. P. 369–387.
3. Müller N. // *Schizophr. Bull.* 2018. V. 44. № 5. P. 973–982.
4. Sullivan C.R., O'Donovan S.M., McCullumsmith R.E., Ramsey A. // *Biol. Psychiatry*. 2018. V. 83. № 9. P. 739–750.
5. Zuccoli G.S., Saia-Cereda V.M., Nascimento J.M., Martins-de-Souza D. // *Front. Neurosci.* 2017. V. 11. P. 493.
6. Kim Y., Vadodaria K.C., Lenkei Z., Kato T., Gage F.H., Marchetto M.C., Santos R. // *Antioxid. Redox Signal.* 2019. V. 31. № 4. P. 275–317.
7. Li S., Xiong G.J., Huang N., Sheng Z.H. // *Nat. Metab.* 2020. V. 2. № 10. P. 1077–1095.
8. Harris J.J., Jolivet R., Attwell D. // *Neuron*. 2012. V. 75. № 5. P. 762–777.
9. Magistretti P., Allaman I. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2018. V. 19. № 4. P. 235–249.
10. Brown A.M., Ransom B.R. // *Glia*. 2007. V. 55. № 12. P. 1263–1271.
11. Saez I., Duran J., Sinadinovs C., Beltran A., Yanes O., Tevy M.F., Martínez-Pons C., Milán M., Guinovart J.J. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2014. V. 34. V. 6. P. 945–955.
12. Wallimann T., Tokarska-Schlattner M., Schlattner U. // *Amino Acids*. 2011. V. 40. № 5. P. 1271–1296.
13. Watts M.E., Pockock R., Claudianos C. // *Front. Mol. Neurosci.* 2018. V. 11. P. 216.
14. Weber B., Barros L.F. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2015. V. 7. № 12. a020396.
15. Pellerin L., Magistretti P.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. № 22. P. 10625–10629.
16. Boksha I.S. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2004. V. 69. № 7. P. 705–19.
17. Rose J., Brian C., Pappa A., Panayiotidis M.I., Franco R. // *Front. Neurosci.* 2020. V. 14. P. 536682.
18. Panov A., Orynbayeva Z., Vavilin V., Lyakhovich V. // *Biomed. Res. Int.* 2014. V. 2014. P. 472459.
19. Patel A.B., Lai J.C.K., Chowdhury G.M.I., Hyder F., Rothman D.L., Shulman R. G., Behar K.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. P. 5385–5390.
20. Ebert D., Haller R.G., Walton M.E. // *J. Neurosci.* 2003. V. 23. № 13. P. 5928–5935.
21. Jekabsons M.B., Nicholls D.G. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 32989–3000.
22. Connolly N.M.C., Dussmann H., Anilkumar U., Huber H.J., Prehn J.H.M. // *J. Neurosci.* 2014. V. 34. P. 10192–10205.
23. Rangaraju V., Calloway N., Ryan T.A. // *Cell*. 2014. V. 156. P. 825–835.
24. Hjelm B.E., Rollins B., Mamdani F., Lauterborn J.C., Kirov G., Lynch G., Gall C.M., Sequeira A., Vawter M.P. // *Mol. Neuropsychiatry*. 2015. V. 1. № 4. P. 201–219.
25. Middleton F.A., Mirnics K., Pierri J.N., Lewis D.A., Levitt P. // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. № 7. P. 2718–2729.

26. *Iwamoto K., Bundo M., Kato T.* // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. № 2. P. 241–253.
27. *Altar C.A., Jurata L.W., Charles V., Lemire A., Liu P., Bukhman Y., Young T. A., Bullard J., Yokoe H., Webster M.J., Knable M.B., Brockman J.A.* // *Biol. Psychiatry.* 2005. V. 58. № 2. P. 85–96.
28. *Stone W.S., Faraone S.V., Su J., Tarbox S.I., Van Eerdeghe P., Tsuang M.T.* // *Am J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2004. V. 127B. № 1. P. 5–10.
29. *Saleh A.A., Elhelbawy N.G., Azmy R.M., Abdelshafy M.S., Donia S.S., Abd El Gayed E.M.* // *Biochem. Biophys. Rep.* 2022. V. 30. P. 101234.
30. *Nascimento J.M., Martins-de-Souza D.* // *NPJ Schizophr.* 2015. V. 1. P. 14003.
31. *Bayés A., Grant S.G.N.* // *Nat. Rev. Neurosci.* 2009. V. 10. P. 635–646.
32. *Saia-Cereda V.M., Cassoli J.S., Martins-de-Souza D., Nascimento J.M.* // *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2017. V. 267. № 1. P. 3–17.
33. *Regenold W.T., Phatak P., Marano C.M., Sassan A., Conley R.R., Kling M.A.* // *Biol. Psychiatry.* 2009. V. 65. № 6. P. 489–494.
34. *Holmes E., Tsang T.M., Huang J.T., Leweke F.M., Koethe D., Gerth C.W., Nolden B.M., Gross S., Schreiber D., Nicholson J.K., Bahn S.* // *PLoS Med.* 2006. V. 3. № 8. e327.
35. *Rowland L.M., Pradhan S., Korenic S., Wijtenburg S.A., Hong L.E., Edden R. A., Barker P.B.* // *Transl. Psychiatry.* 2016. V. 6. № 11. e967.
36. *McCullumsmith R.E.* // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 5087.
37. *Martins-de-Souza D., Gattaz W.F., Schmitt A., Rewerts C., Maccarrone G., Dias-Neto E., Turck C.W.* // *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2009. V. 259. № 3. P. 151–163.
38. *Prabakaran S., Swatton J.E., Ryan M.M., Huffaker S.J., Huang J.T., Griffin J.L., Wayland M., Freeman T., Dudbridge F., Lilley K.S., Karp N.A., Hester S., Tkachev D., Mimmack M.L., Yolken R.H., Webster M.J., Torrey E.F., Bahn S.* // *Mol. Psychiatry.* 2004. V. 9. № 7. P. 684–697, 643.
39. *Shan D., Mount D., Moore S., Haroutunian V., Meador-Woodruff J.H., McCullumsmith R.E.* // *Schizophr Res.* 2014. V. 154. № 1–3. P. 1–13.
40. *De Jesus A., Keyhani-Nejad F., Pusec C.M., Goodman L., Geier J.A., Stoolman J.S., Stanczyk P.J., Nguyen T., Xu K., Suresh K.V., Chen Y., Rodriguez A.E., Shapiro J.S., Chang H.C., Chen C., Shah K.P., Ben-Sahra I., Layden B.T., Chandel N.S., Weinberg S.E., Ardehali H.* // *Mol. Cell.* 2022. V. 82. № 7. P. 1261–1277.e9.
41. *Genda E.N., Jackson J.G., Sheldon A.L., Locke S.F., Greco T.M., O'Donnell J.C., Spruce L.A., Xiao R., Guo W., Putt M., Seeholzer S., Ischiropoulos H., Robinson M.B.* // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. № 50. P. 18275–18288.
42. *Regenold W.T., Pratt M., Nekkhalpu S., Shapiro P.S., Kristian T., Fiskum G.* // *J. Psychiatr. Res.* 2012. V. 46. № 1. P. 95–104.
43. *Martins-de-Souza D., Gattaz W.F., Schmitt A., Maccarrone G., Hunyadi-Gulyás E., Eberlin M.N., Souza G.H., Marangoni S., Novello J.C., Turck C.W., Dias-Neto E.* // *J. Psychiatr. Res.* V. 43. № 11. P. 978–986.
44. *Martins-de-Souza D., Gattaz W.F., Schmitt A., Novello J.C., Marangoni S., Turck C.W., Dias-Neto E.* // *BMC Psychiatry.* V. 9. P. 17.
45. *Clark D., Dedova I., Cordwell S., Matsumoto I.* // *Proteomics Clin. Appl.* 2007. V. 1. № 2. P. 157–166.
46. *Beasley C.L., Pennington K., Behan A., Wait R., Dunn M.J., Cotter D.* // *Proteomics.* 2006. V. 6. № 11. P. 3414–3425.
47. *Martins-de-Souza D., Maccarrone G., Wobrock T., Zerr I., Gormanns P., Reckow S., Falkai P., Schmitt A., Turck C.W.* // *J. Psychiatr. Res.* 2010. V. 44. № 16. P. 1176–1189.
48. *Pennington K., Beasley C.L., Dicker P., Fagan A., English J., Pariante C.M., Wait R., Dunn M.J., Cotter D.R.* // *Mol. Psychiatry.* 2008. V. 13. № 12. P. 1102–1117.
49. *Sivagnanasundaram S., Crossett B., Dedova I., Cordwell S., Matsumoto I.* // *Proteomics Clin. Appl.* 2007. V. 1. № 10. P. 1291–1305.
50. *Nesvaderani M., Matsumoto I., Sivagnanasundaram S.* // *Aus. N. Z. J. Psychiatry.* V. 43. № 4. P. 310–322.
51. *Pruett B.S., Meador-Woodruff J.H.* // *Schizophr. Res.* 2020. V. 223. P. 29–42.
52. *Rajasekaran A., Venkatasubramanian G., Berk M., Debnath M.* // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2015. V. 48. P. 10–21.
53. *Xu H., Yang F.* // *Transl. Psychiatry.* 2022. V. 12. № 1. P. 464.
54. *Li Z., Okamoto K., Hayashi Y., Sheng M.* // *Cell.* 2004. V. 119. № 6. P. 873–887.
55. *Chen H., Detmer S.A., Ewald A.J., Griffin E.E., Fraser S.E., Chan D.C.* // *J. Cell. Biol.* 2003. V. 160. № 2. P. 189–200.
56. *Ishihara N., Nomura M., Jofuku A., Kato H., Suzuki S.O., Masuda K., Otera H., Nakanishi Y., Nonaka I., Goto Y., Taguchi N., Morinaga H., Maeda M., Takayanagi R., Yokota S., Mihara K.* // *Nat. Cell. Biol.* 2009. V. 11. № 8. P. 958–966.
57. *Robicsek O., Karry R., Petit I., Salman-Kesner N., Müller F.J., Klein E., Aberdam D., Ben-Shachar D.* // *Mol. Psychiatry.* 2013. V. 18. № 10. P. 1067–1076.
58. *Ene H.M., Karry R., Farfara D., Ben-Shachar D.* // *Mol. Psychiatry.* 2023. V. 28. № 3. P. 1170–1181. <https://doi.org/10.1038/s41380-022-01865-4>
59. *de Oliveira L., Fraga D.B., De Luca R.D., Canever L., Ghedim F.V., Matos M. P., Streck E.L., Quevedo J., Zugno A.I.* // *Metab. Brain. Dis.* 2011. V. 26. № 1. P. 69–77.
60. *Ben-Shachar D.* // *J. Neurochem.* 2002. V. 83. № 6. P. 1241–1251.
61. *Park C., Park S.K.* // *Mol. Cells.* 2012. V. 33. № 2. P. 105–110.
62. *Anglin R.E., Tarnopolsky M.A., Mazurek M.F., Rosebush P.I.* // *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* 2012. V. 24. № 4. P. 394–409.
63. *Marin S.E., Saneto R.P.* // *Neurol. Clin.* 2016. V. 34. № 1. P. 247–94.
64. *Rosebush P.I., Anglin R.E., Rasmussen S., Mazurek M.F.* // *Schizophr. Res.* 2017. V. 187. P. 33–37.

65. *Riquin E., Duverger P., Cariou C., Barth M., Prouteau C., Van Bogaert P., Bonneau D., Roy A.* // *Front. Psychiatry*. 2020. V. 11. P. 747
66. *Dean B., Thomas N., Scarr E., Udawela M.* // *Transl. Psychiatry*. 2016. V. 6. № 11. e949.
67. *Clark D., Dedova I., Cordwell S., Matsumoto I.* // *Mol. Psychiatry*. 2006. V. 11. № 5. P. 459–470. 423.
68. *Bubber P., Hartounian V., Gibson G.E., Blass J.P.* // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2011. V. 21. № 3. P. 254–260.
69. *Maurer I., Zierz S., Möller H.* // *Schizophr. Res.* V. 48. № 1. P. 125–136.
70. *Ben-Shachar D., Karry R.* // *PloS One*. 2008. V. 3. № 11. e3676.
71. *Das S.C., Hjelm B.E., Rollins B.L., Sequeira A., Morgan L., Omidasalar A.A., Schatzberg A.F., Barchas J.D., Lee F.S., Myers R.M., Watson S.J., Akil H., Bunney W.E., Vawter M.P.* // *Transl. Psychiatry*. 2022. V. 12. № 1. P. 353.
72. *Rosenfeld M., Brenner-Lavie H., Ari S.G., Kavushansky A., Ben-Shachar D.* // *Biol. Psychiatry*. 2011. V. 69. № 10. P. 980–988.
73. *Невиницына Т.А., Шеремет Н.И.* // *Вестник офтальмологии*. 2016. Т. 132. № 1. С. 91–96.
74. *Whatley S.A., Curti D., Marchbanks R.M.* // *Neurochem. Res.* 1996. V. 21. № 9. P. 995–1004.
75. *Rice M.W., Smith K.L., Roberts R.C., Perez-Costas E., Melendez-Ferro M.* // *PLoS One*. V. 9. № 6. e100054.
76. *Maurer I., Zierz S., Möller H.* // *Schizophr. Res.* 2001. V. 48. № 1. P. 125–136.
77. *Cavelier L., Jazin E.E., Eriksson I., Prince J., Båve U., Orelund L., Gyllenstein U.* // *Genomics*. 1995. V. 29. № 1. P. 217–224.
78. *Holper L., Ben-Shachar D., Mann J.J.* // *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2019. V. 29. № 9. P. 986–1002.
79. *Ben-Shachar D., Zuk R., Gazawi H., Reshef A., Sheinkman A., Klein E.* // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 1999. V. 2. № 4. P. 245–253.
80. *Dror N., Klein E., Karry R., Sheinkman A., Kirsh Z., Mazor M., Tzukerman M., Ben-Shachar D.* // *Mol. Psychiatry*. 2002. V. 7. № 9. P. 995–1001.
81. *Бурбаева Г.Ш., Бокша И.С., Каледа В.Г., Бархатова А.Н., Турищева М.С., Омельченко М.А., Терешкина Е.Б., Савушкина О.К., Стародубцева Л.И., Прохорова Т.А., Воробьева Е.А.* // *Журн. неврол. и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2011. Т. 111. № 9. С. 61–66.
82. *Burbaeva G., Boksha I., Turishcheva M., Savushkina O., Beniashvili A., Rupchev G., Morozova M.* // *Health*. 2011. V. 3. P. 13–19.
83. *Савушкина О.К., Бокша И.С., Омельченко М.А., Терешкина Е.Б., Прохорова Т.А., Воробьева Е.А., Бурбаева Г.Ш.* // *Журн. неврол. психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2022. Т. 122. № 8. С. 136–144.
84. *Boksha I.S., Omel'chenko M.A., Savushkina O.K., Prokhorova T.A., Tereshkina E.B., Vorobyeva E.A., Burbaeva G.S.* // *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 2023. V. 273. № 1. P. 157–168.
<https://doi.org/10.1007/s00406-022-01396-7>
85. *Clay H.B., Sullivan S., Konradi C.* // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2011. V. 29. № 3. P. 311–324.
86. *Ramsay R.R., Gandour R.D., van der Leij F.R.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2001. V. 1546. № 1. P. 21–43.
87. *Yuksel C., Tegin C., O'Connor L., Du F., Ahat E., Cohen B.M., Ongur D.* // *J. Psychiatric Res.* 2015. V. 68. P. 157–166.
88. *Klemm S., Rzanny R., Riehemann S., Volz H.P., Schmidt B., Gerhard U.J., Filz C., Schönberg A., Mentzel H.J., Kaiser W.A., Blanz B.* // *Am. J. Psychiatry*. 2001. V. 158. № 6. P. 958–960.
89. *Volz H.P., Rzanny R., Rössger G., Hübner G., Kreitschmann-Andermahr I., Kaiser W.A., Sauer H.* // *Psychiatry Res.* 1997. V. 76. № 2–3. P. 123–129.
90. *Yuksel C., Chen X., Chouinard V.A., Nickerson L.D., Gardner M., Cohen T., Öngür D., Du F.* // *Schizophr. Bull. Open*. 2021. V. 2. № 1. sgaa073.
91. *Behan A.T., Byrne C., Dunn M.J., Cagney G., Cotter D.R.* // *Mol. Psychiatry*. 2009. V. 14. № 6. P. 601–613.
92. *Савушкина О.К., Терешкина Е.Б., Прохорова Т.А., Воробьева Е.А., Бокша И.С., Бурбаева Г.Ш.* // *Журн. неврол. психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2016. Т. 116. № 9. С. 62–68.
93. *Савушкина О.К., Терешкина Е.Б., Прохорова Т.А., Воробьева Е.А., Бокша И.С., Бурбаева Г.Ш.* // *Психиатрия*. 2016. Т. 2. № 70. С. 21–27.
94. *Du F., Cooper A.J., Thida T., Sehovic S., Lukas S.E., Cohen B.M., Zhang X., Ongür D.* // *JAMA psychiatry*. 2014. V. 71. № 1. P. 19–27.
95. *Song X., Chen X., Yuksel C., Yuan J., Pizzagalli D.A., Forester B., Öngür D., Du F.* // *Mol. Psychiatry*. 2021. V. 26. № 6. P. 2483–2492.
96. *Xu J., Fu X., Pan M., Zhou X., Chen Z., Wang D., Zhang X., Chen Q., Li Y., Huang X., Liu G., Lu J., Liu Y., Hu Y., Pan S., Wang Q., Wang Q., Xu Y.* // *Aging Dis.* 2019. V. 10. № 3. P. 601–610.
97. *Meltzer H.Y., Ross-Stanton J.* // *Arch. Gen. Psychiatry*. 1980. V. 37. № 6. P. 650–655.
98. *Manor I., Hermesh H., Valevski A., Benjamin Y., Munitz H., Weizman A.* // *Biol. Psychiatry*. 1998. V. 43. № 4. P. 288–292.
99. *Hollander S., Hochman E., Shoval G., Taler M., Trommer S., Hermesh H., Weizman A., Krivoy A.* // *Psychiatry Res.* 2016. V. 238. P. 333–337.
100. *Meng X.D., Cao X., Li T., Li J.P.* // *Schizophr. Res.* 2018. V. 197. P. 478–483.
101. *Parikh S., Goldstein A., Koenig M.K., Scaglia F., Enns G.M., Saneto R., Anselm I., Cohen B.H., Falk M.J., Greene C., Gropman A.L., Haas R., Hirano M., Morgan P., Sims K., Tarnopolsky M., Van Hove J.L., Wolfe L., DiMauro S.* // *Genet. Med.* 2015. V. 17. № 9. P. 689–701.
102. *Avula S.* // *Curr. Treat. Options Neurol.* 2014. V. 16. № 6. P. 292.
103. *Jones L.L., McDonald D.A., Borum P.R.* // *Prog. Lipid Res.* 2010. V. 49. № 1. P. 61–75.
104. *Nierenberg A.A., Kansky C., Brennan B.P., Shelton R.C., Perlis R., Iosifescu D.V.* // *Aust. N Z J. Psychiatry*. 2013. V. 47. № 1. P. 26–42.
105. *Меднова И.А., Серебров В.Ю., Байков А.Н., Бохан Н.А., Иванова С.А.* // *Бюлл. сибирской медицины*. 2019. Т. 18. № 4. С. 197–208.

106. Cao B., Wang D., Pan Z., Brietzke E., McIntyre R.S., Musial N., Mansur R.B., Subramaniepillai M., Zeng J., Huang N., Wang J. // *Transl. Psychiatry*. 2019. V. 9. № 1. P. 19.
107. Соколова Л.П., Старых Е.В. // *Журн. неврол. психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2022. Т. 122. № 4. С. 44–51.
108. Freo U., Brugnatelli V., Turco F., Zanette G. // *Front. Neurosci.* 2021. V. 15. P. 584649.
109. Bruno A., Pandolfo G., Crucitti M., Lorusso S., Zoccali R.A., Muscatello M.R. // *Clin. Neuropharmacol.* 2016. V. 39. № 6. P. 277–280.
110. Kulkarni S., Biswal J., Mohapatra D., Mishra S.N., Sahoo S. // *Indian. J. Psychiatry*. 2022. V. 64. Suppl 3. S568.
111. Maguire Á., Hargreaves A., Gill M. // *Nutr. Neurosci.* 2020. V. 23. № 10. P. 756–769.
112. Maguire Á., Mooney C., Flynn G., Ferguson Y., O’Keane V., O’Rourke D., McMonagle T., Heaton R., Phillips S., Hargreaves I., Gill M., Hargreaves A. // *J. Clin. Psychopharmacol.* 2021. V. 41. № 1. P. 53–57.
113. Yamazaki M., Igarashi H., Hamamoto M., Miyazaki T., Nonaka I. // *Rinsho Shinkeigaku*. 1991. V. 31. № 11. P. 1219–1223.
114. Bradlow R.C.J., Berk M., Kalivas P.W., Back S.E., Kanaan R.A. // *CNS Drugs*. 2022. V. 36. № 5. P. 451–482.
115. Пятойкина А.С., Жилева Т.В., Семенов И.В., Мишанов Г.А., Благодравова А.С., Мазо Г.Э. // *Журн. неврол. психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020. Т. 120. № 9. С. 66–71.
116. Тутельян В.А., Махова А.А., Погужева А.В., Ших Е.В., Елизарова Е.В., Хотимченко С.А. // *Вопр. питания*. 2019. Т. 88. № 4. С. 6–11.
117. Mishra A., Reeta K.H., Sarangi S.C., Maiti R., Sood M. // *Psychopharmacol (Berl)*. 2022. V. 239. № 11. P. 3525–3535.
118. De Lima D.N. Jr., Costa Filho C.W.L., Frota I.J., de Oliveira A.L.B., Menezes C.E.S., Chaves Filho A.J.M., Viana G.A., Campos E.M., Collares M., de Queiroz M.G.R., da Cruz Fonseca S.G., Vasconcelos S.M.M., Macêdo D.S., Sanders L.L.O. // *J. Clin. Psychopharmacol.* 2023. V. 43. № 1. P. 39–45.
119. Samuni Y., Goldstein S., Dean O.M., Berk M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1830. № 8. P. 4117–4129.
120. Yolland C.O., Hanratty D., Neill E., Rossell S.L., Berk M., Dean O.M., Castle D.J., Tan E.J., Phillipou A., Harris A.W., Barreiros A.R., Hansen A., Siskind D. // *Aust. N Z J. Psychiatry*. 2020. V. 54. № 5. P. 453–466.
121. Воронина Т.А. // *Фарматека*. 2009. Т. 180. № 6. С. 1–4.
122. Шулькин А.В. // *Журн. неврол. психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2012. Т. 112. № 2. С. 35–39.
123. Шамрей В.К., Курасов Е.С., Нечипоренко В.В., Колчев А.И., Цыган Н.В. // *Журн. неврол. психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2020. Т. 120. № 5. С. 160–164.
124. Савушкина О.К., Бокиа И.С., Шешенин В.С., Терешкина Е.Б., Прохорова Т.А., Почуева В.В., Воробьева Е.А., Бурбаева Г.Ш. // *Неврологический вестник*. 2021. Т. LIII. № 4. С. 40–50.
125. Дьяконов А.Л. // *Психиатрия и психофармакотерапия*. 2011. Т. 4. С. 28–32.
126. Mehran Shayganfard // *Cell Biosci*. 2020. V. 10. № 1. P. 128.
127. Samaei A., Moradi K., Bagheri S., Ashraf-Ganjouei A., Alikhani R., Mousavi S.B., Rezaei F., Akhondzadeh S. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2020. V. 23. № 12. P. 775–782.
128. Zortea K., Franco V.C., Francesconi L.P., Cereser K.M., Lobato M.I., Belmonte-de-Abreu P.S. // *Nutrients*. 2016. V. 8. № 2. P. 73.
129. Zortea K., Franco V.C., Guimarães P., Belmonte-de-Abreu P.S. // *Front. Psychiatry*. 2016. V. 7. P. 159.
130. Mayo K.M., Falkowski W., Jones C.A. // *Br. J. Psychiatry*. 1993. V. 162. P. 543–545.
131. Topyurek M., Tibbo P., Núñez C., Stephan-Otto C., Good K. // *Schizophr. Res.* 2019. V. 211. P. 34–35.
132. Núñez C., Stephan-Otto C., Cuevas-Esteban J., Maria Haro J., Huerta-Ramos E., Ochoa S., Usall J., Brébion G. // *Psychiatr. Res.* 2015. V. 230. № 3. P. 924–931.
133. Topyurek M., Tibbo P.G., Good K. // *Clin. Schizophr. Relat. Psychoses*. 2020. V. 14. P. 1.
134. Ribeiro J.A., Sebastião A.M. // *J. Alzheimers Dis*. 2010. V. 20. Suppl 1. P. S3–S15.
135. Jones F. Jing J., Stonehouse A.H., Stevens A., Edelman G.M. // *Mol. Pharmacol.* 2008. V. 74. № 3. P. 673–684.
136. Lyoo I.K., Kong S.W., Sung S.M., Hirashima F., Parow A., Hennen J., Cohen B.M., Renshaw P.F. // *Psychiatry Res.* 2003. V. 123. № 2. P. 87–100.
137. Marshall R.P., Droste J.N., Giessing J., Kreider R.B. // *Nutrients*. 2022. V. 14. № 3. P. 529.
138. Smith R.N., Agharkar A.S., Gonzales E.B. // *F1000Res*. 2014. V. 3. P. 222.
139. Levental U., Bersudsky Y., Dwalatzky T., Lerner V., Medina S., Levine J. // *Isr. J. Psychiatry Relat. Sci.* 2015. V. 52. № 1. P. 6–10.
140. Kaptzan A., Odessky A., Osher Y., Levine J. // *J. Clin. Psychiatry*. 2007. V. 68. № 6. P. 881–884.
141. Yang J., Chen T., Sun L., Zhao Z., Qi X., Zhou K., Cao Y., Wang X., Qiu Y., Su M., Zhao A., Wang P., Yang P., Wu J., Feng G., He L., Jia W., Wan C. // *Mol. Psychiatry*. 2013. V. 18. № 1. P. 67–78.
142. Sethi S., Ford J.M. // *J. Psychiatr. Brain Sci.* 2022. V. 7. № 5. P. e220009.
143. McDaniel S.S., Rensing N.R., Thio L.L., Yamada K.A., Wong M. // *Epilepsia*. 2011. V. 52. № 3. P. e7–e11.
144. Calderón N., Betancourt L., Hernández L., Rada P. // *Neurosci. Lett.* 2017. V. 642. P. 158–162.
145. Bozzi Y., Casarosa S., Caleo M. // *Front. Psychiatry*. 2012. V. 3. P. 19.
146. Palmer C.M., Gilbert-Jaramillo J., Westman E.C. // *Schizophr. Res.* 2019. V. 208. P. 439–440.
147. Sarnyai Z., Kraeuter A.K., Palmer C.M. // *Curr. Opin. Psychiatry*. 2019. V. 32. № 5. P. 394–401.
148. Pacheco A., Easterling W.S., Pryer M.W. // *Am. J. Psychiatry*. 1965. V. 121. P. 1110–1111.
149. Kraft B.D., Westman E.C. // *Nutr. Metab. (Lond.)*. 2009. V. 6. P. 10.

150. Gilbert-Jaramillo J., Vargas-Pico D., Espinosa-Mendoza T., Falk S., Llanos-Fernandez K., Guerrero-Haro J., Orellana-Roman C., Poveda-Loor C., Valdevila-Figueira J., Palmer C. // *Clin. Nutr. Metab.* 2018. V. 5. P. 1–5.
https://doi.org/10.15761/CNM.1000105
151. Palmer C.M. // *Schizophr. Res.* 2017. V. 189. P. 208–209.
152. Danan A., Westman E.C., Saslow L.R., Ede G. // *Front. Psychiatry.* 2022. V. 13. P. 951376.
153. Bostock E.C., Kirkby K.C., Taylor B.V. // *Front. Psychiatry.* 2017. V. 8. P. 43.
154. Morris G., Puri B.K., Carvalho A., Maes M., Berk M., Ruusunen A., Olive L. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2020. V. 23. № 6. P. 366–384.
155. Kovács Z., D'Agostino D.P., Diamond D., Kindy M.S., Rogers C., Ari C. // *Front. Psychiatry.* 2019. V. 10. P. 363.
156. Schulz S.C., van Kammen D.P., Buchsbaum M.S., Roth R.H., Alexander P., Bunney W.E., Jr. // *Pharmacopsychiatria.* 1981. V. 14. № 4. P. 129–134.
157. Huang Y.C., Lin P.Y., Lee Y., Wu C.C., Hsu S.T., Hung C.F., Chen C.C., Chong M.Y., Lin C.H., Wang L.J. // *Psychoneuroendocrinology.* 2016. V. 73. P. 1–8.
158. Li C., Wang A., Wang C., Ramamurthy J., Zhang E., Guadagno E., Trakadis Y. // *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.* 2018. V. 177. № 6. P. 580–588.
159. Fukushima T., Iizuka H., Yokota A., Suzuki T., Ohno C., Kono Y., Yoshio T. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 7. P. e101652.
160. Фролов В.М., Кутько И.И., Пересадин Н.А. // *Росс. психиатр. журн.* 2012. № 4. С. 71–75.
161. Sarris J., Ravindran A., Yatham L.N., Marx W., Rucklidge J.J., McIntyre R.S., Akhondzadeh S., Benedetti F., Caneo C., Cramer H., Cribb L., de Manincor M., Dean O., Deslandes A.C., Freeman M.P., Gangadhar B., Harvey B.H., Kasper S., Lake J., Lopresti A., Lu L., Metri N.J., Mischoulon D., Ng C.H., Nishi D., Rahimi R., Seedat S., Sinclair J., Su K.P., Zhang Z.J., Berk M. // *World J. Biol. Psychiatry.* 2022. V. 23. № 6. P. 424–455.

Anomalies of Energy Metabolism in Schizophrenia and Possible Pathogenetic-Targeted Therapeutic Approaches

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

^aFederal state budgetary scientific institution Mental health research center, Moscow, Russia

Coordinated regulation of energy conversion processes in the brain maintains its highly productive work and efficient mental activity. Impairments of the brain energy metabolism are considered among pathogenetic factors in the schizophrenia origin, but presently it is difficult to say whether these impairments are primary and causative the development of the disease or represent consequences of certain changes in the functioning of neurotransmitter and other neurochemical systems. This review discusses the main results of the energy metabolism research in schizophrenia – at various levels and using different approaches, as well as regards some attempts of influencing the energy processes in the brain as an adjunctive therapy in schizophrenia. To date, the efficacy of these therapeutic approaches has not been proven, this may be due to the paucity of studies and the lack of preliminary identification/stratification of patient subgroups to whom the energy metabolism-targeted therapy would be the most useful. Based on the data presented, one can conclude that an analysis is necessary of relationships between the psychopathological manifestations of schizophrenia and energy metabolism deviations for further identification of those patients to whom the use of mitochondrial modulators, mitoprotection, and other approaches may represent a promising method of adjunctive therapy.

Keywords: schizophrenia, energy metabolism, therapeutic approaches, mitochondria, glycolysis

УДК 571.27

Т-КЛЕТОЧНЫЕ АСПЕКТЫ РАЗВИТИЯ НЕКОТОРЫХ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

© 2023 г. А. А. Квичанский¹, А. П. Большаков¹, *¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 10.04.2023 г.

После доработки 11.04.2023 г.

Принята к публикации 12.04.2023 г.

Полиневропатии — это гетерогенная группа иммунно-опосредованных заболеваний, среди которых синдром Гийена-Барре и хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия занимают основное место. Напротив, боковой амиотрофический склероз чаще всего рассматривается как заболевание, развитие которого практически не связывают с изменениями функции иммунной системы. В представленном обзоре суммированы последние данные об изменениях в численности субпопуляций Т-лимфоцитов и их функции в крови и ликворе при указанных выше заболеваниях. Эти данные говорят о том, что НКТ-клетки и нарушение функционирования регуляторных Т-клеток могут играть важную роль в развитии обсуждаемых патологий. Обсуждается необходимость накопления и анализа данных по субпопуляциям Т-клеток, а также последовательности Т-клеточных рецепторов, HLA, и CD1 у пациентов для разработки подходов к диагностике и возможной терапии указанных заболеваний.

Ключевые слова: Т-лимфоцит, боковой амиотрофический склероз, хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия, синдром Гийена-Барре

DOI: 10.31857/S1027813323040155, **EDN:** OPWLXI

Исследования, проведенные в последние годы, говорят о том, что ряд заболеваний нервной системы ассоциирован с изменениями в функционировании иммунной системы. Часть неврологических заболеваний, такие как синдром Гийена-Барре (СГБ) и хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия (ХВДП), считаются приобретенными заболеваниями периферической нервной системы, в патогенезе которых ведущую роль играют первичные нарушения работы иммунной системы, включающие в себя активацию воспалительных процессов [1]. Предполагается, что одну из ведущих ролей в развитии полиневропатий играют Т-лимфоциты. В то же время существуют неврологические заболевания, при которых участие иммунитета в патогенезе заболевания является неочевидным, поскольку изменения в состоянии иммунитета носят атипичный характер. Ярким примером такого заболевания является боковой амиотрофический склероз (БАС), поскольку для него характерно изменение доли Т-регуляторных клеток в общей субпопуляции Т-клеток крови при очень слабом провоспалительном сдвиге в иммунитете и появлении в ряде случаев антител к некоторым белкам

моторных нейронов [2]. Существующие данные говорят о том, что при упомянутых заболеваниях может происходить накопление или, наоборот, потеря Т-клеток, осуществляющих контроль течения воспаления как в периферической, так и в центральной нервной системе. Однако особенно Т-клеточной компоненты иммунитета при данных заболеваниях остаются мало исследованными.

Упомянутые неврологические заболевания встречаются относительно редко (1.1–1.8 на 100000 человек для СГБ [3], 1–3 на 100000 человек для ХВДП [4], и 1.1–8.2 на 100000 человек для БАС [5]); поэтому работы, посвященные исследованиям разных аспектов патогенеза этих заболеваний, обычно включают лишь данные по нескольким пациентам и сфокусированы лишь на некоторых сторонах патогенеза, оставляя множество других аспектов нераскрытыми. Именно вследствие невысокой частоты встречаемости этих болезней происходит медленное накопление данных о них, и их этиология остается практически неизвестной.

СГБ и ХВДП прежде всего рассматриваются как заболевания периферической нервной системы, поскольку при них нарушается функция именно периферических нервов. Однако поиск

* Адресат для корреспонденции: 117485, Москва, ул. Бутлерова 5а, e-mail: ocrachek@yahoo.com.

биомаркеров этих заболеваний в крови и цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) показал, что изменения наблюдаются как в крови, так и ЦСЖ. Важно отметить, что изменения в ЦСЖ включают в себя не только неспецифическое повышение уровня белка, но также изменения уровня специфических белков, причем для каждого заболевания набор белков достаточно специфичен и зависит от стадии заболевания. На данном вопросе мы останавливаться подробно не будем и адресуем читателя к последним обзорам по этой теме [6–8]. Изменения в уровне белков в ЦСЖ при указанных заболеваниях явно говорят о том, что патогенез этих заболеваний активно затрагивает ЦНС.

Значимую роль во взаимодействии центральной нервной системы (ЦНС) и иммунной системы (ИС) играют клетки, участвующие в формировании адаптивного иммунитета, а, если точнее, то Т-лимфоциты. Исследования, направленные на выяснение роли Т-клеток в функционировании ЦНС, показали, что эти клетки, несмотря на свою важнейшую роль в адаптивном иммунитете, являются важным фактором, поддерживающим нормальное функционирование ЦНС в условиях, когда активации иммунитета не происходит. Анализ функциональной роли Т-клеток в ликворе и хороидном сплетении здоровых животных показал, что Т-хелперы, локализованные в оболочках мозга и хороидном сплетении, критически необходимы для нормального функционирования мозга, обучения и формирования памяти [9].

Т-ЛИМФОЦИТЫ И ЦНС

Т-лимфоциты являются важной частью специфической иммунной системы. Они несут на своей поверхности гипервариабельный Т-клеточный рецептор (TCR), который распознает процессированный антиген в комплексе с молекулой главного комплекса гистологической совместимости I или 2 типа (MHC1/2). У зрелых клеток рецептор представляет из себя гетеродимер, состоящий из α и β , или γ - и δ -цепей ($\alpha\beta$ - и $\gamma\delta$ -клетки, соответственно). Каждая цепь TCR состоит из константного и вариабельного доменов. Вариабельные домены TCR формируются за счет альтернативной делеции экзонов из геномного локуса на хромосоме. При этой хромосомной перестройке происходит ряд хромосомных делеций и нематричных заполнений промежутков, что приводит к формированию уникальной последовательности зрелого гена TCR [10]. В дальнейшем, Т-лимфоциты подвергаются положительной селекции по способности TCR связывать MHC, отрицательной селекции по аутореактивности, и положительной селекции по способности узнавать презентированный антиген. Т-клетка, прошедшая все стадии селекции, может сформировать клон, с уникаль-

ной последовательностью TCR. Далее, взаимодействие с антигеном может привести к размножению определенного клона Т-клеток. В зависимости от множества факторов представленность различных клонов TCR в организме может значительно различаться, что позволяет говорить о клональной экспансии [11].

Как было сказано выше, экспонирование антигена в комплексе с MHC необходимо для его распознавания при помощи TCR. MHC каждого типа в человеческой популяции представлены не менее чем сотней аллельных вариантов. Эти варианты могут обладать различным сродством как TCR, так и к презентуемым антигенам белковой природы [12]. Это разнообразие, вероятно, закрепилось для обеспечения эффективного популяционного иммунитета [13], но оно же приводит и к формированию склонности к аутоиммунным заболеваниям у носителей ряда аллелей [14]. Предполагается, что разные аллельные варианты MHC могут иметь сродство к разным фрагментам белка, презентуемого в MHC, а также, что фрагменты некоторых чужеродных белков могут иметь структуру, схожую с фрагментами собственных белков организмов. В результате у людей с разными аллельными вариантами MHC комплексы экспонируют на своей поверхности разные фрагменты одного и того же чужеродного белка. Это ведет к формированию разных TCR на один и тот же патоген, и у ряда людей с определенным аллельным вариантом MHC сформированный TCR может оказаться обладающим кросс-реактивностью к собственным антигенам. Этот важный аспект мы обсудим ниже в рамках раздела о невропатиях.

ПОДТИПЫ Т-КЛЕТОК

Выделяют несколько различных подтипов Т-клеток (рис. 1), но два наиболее многочисленных подтипа это Т-киллеры и Т-хелперы. Оба типа клеток экспрессируют TCR, имеющий либо α и β цепи либо γ и δ -цепи. Однако важно отметить, что $\alpha\beta$ -клетки относятся не только к двум упомянутым субпопуляциям, но также к субпопуляции НКТ-клеток. Следует также подчеркнуть, что не все $\gamma\delta$ -клетки можно отнести к Т-киллерам или хелперам, поскольку некоторая их часть не экспрессирует рецепторов, способных взаимодействовать с MHC (1 или 2), и предполагается, что они являются рецепторами, распознающими молекулы как белковой так и небелковой природы [15, 16]. Ниже мы очень коротко остановимся на основных типах Т-клеток, которые по современным данным могут участвовать в развитии рассматриваемых в нашей работе патологий ЦНС.

Т-киллеры распознают антигены в комплексе с молекулой рецептора MHC1, который экспрессирует большинство соматических клеток в организме. Часть белков, синтезированных в клетке,

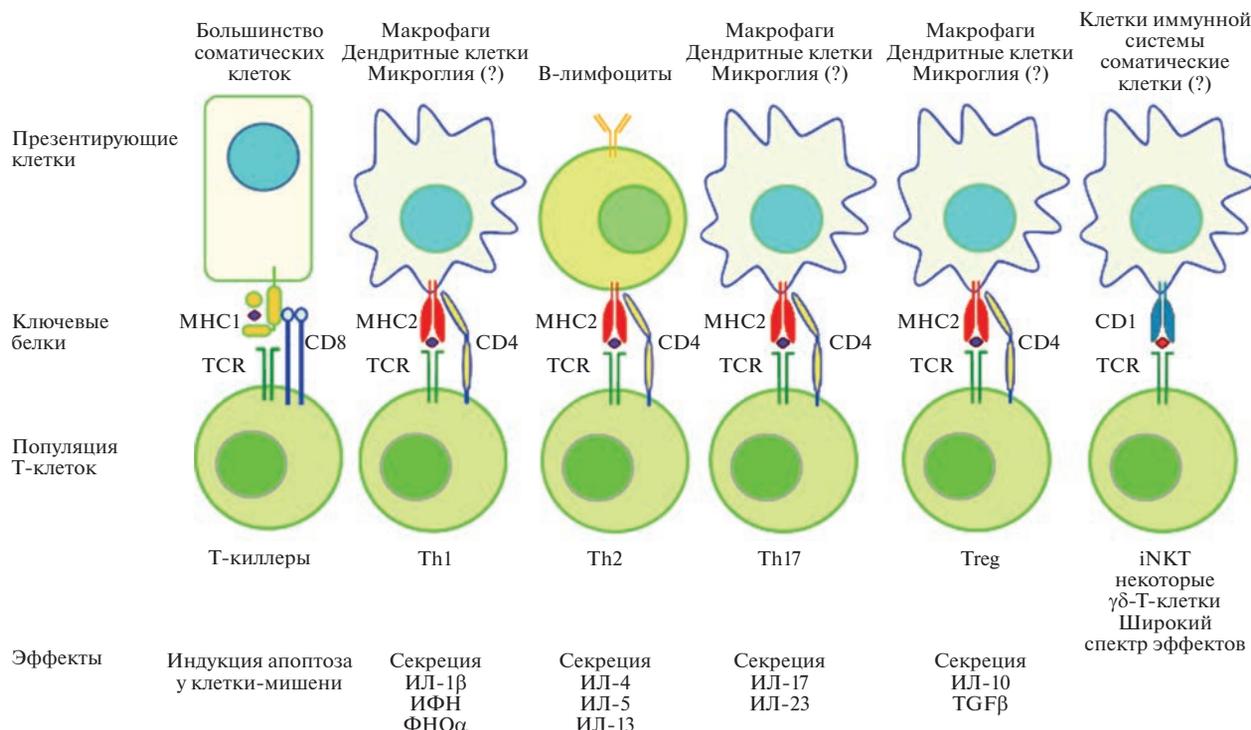


Рис. 1. Основные субпопуляции Т-клеток и их функции.

сразу после синтеза и созревания отправляется на расщепление до пептидов в протеасоме и часть этих пептидов затем экспонируется в комплексе с МНС1. Таким образом клетки демонстрируют иммунной системе профиль экспрессируемых в них белков [17]. Взаимодействие комплекса МНС1 + пептид и TCR Т-киллера обеспечивается корецептором CD8, который является маркером этой популяции лимфоцитов. В случае распознавания антигена при помощи TCR, Т-киллер активирует апоптоз в клетке-мишени. Т-киллеры, как правило, участвуют в противовирусной защите организма и в борьбе с новообразованиями, убивая клетки, экспрессирующие белки, не характерные для нормальной ткани [18]. Если же рассматривать нервную систему, то наиболее известен вклад Т-киллеров в патогенез рассеянного склероза, в ходе которого они участвуют в поражении белого вещества [19]. В то же время, они, по-видимому, постоянно присутствуют в мозге неврологически здоровых людей, вероятно, обеспечивая его противовирусную защиту [20]. В опытах на лабораторных животных была показана критическая важность Т-киллеров мозга для нормального функционирования гиппокамп-зависимой памяти [9]. Непосредственные механизмы функций, осуществляемых Т-киллерами в мозге в настоящее время практически неизвестны.

Т-хелперы являются критически важными клетками-регуляторами иммунных процессов. Они рас-

познают антиген в комплексе с МНС2 на поверхности специализированных антиген-презентующих клеток (АПК), прежде всего, макрофагов, дендритных клеток, В-лимфоцитов и, вероятно, микроглии. Корецептор CD4 является маркером популяции Т-хелперов. Этот белок обеспечивает взаимодействие TCR и МНС2. После распознавания антигена, эти лимфоциты начинают паракринно секретировать про- и противовоспалительные цитокины, определяющие дальнейшую активность окружающих клеток иммунной системы. Спектр выделяемых цитокинов определяет принадлежность Т-хелпера к одной из функциональных популяций. Для ряда субпопуляций Т-хелперов известны функции, которые они выполняют по отношению к ЦНС. Th1-лимфоциты в ответ на активацию секретируют такие цитокины как IFNγ, ИЛ-1β, TNFα, при помощи которых они повышают функциональную активность тканевых макрофагов и микроглии, что позволяет предположить, что данная субпопуляция лимфоцитов активирует нейровоспалительную реакцию как в норме, так и при патологических процессах. Th17-лимфоциты также являются провоспалительными клетками, секретирующими ИЛ-17 и ИЛ-23, отмечена их важная роль в патогенезе астмы, атопического дерматита, постинсультных расстройств и расстройств депрессивного спектра. Регуляторные Т-лимфоциты (Treg), напротив, являются основными противовоспалительными

тельными лимфоцитами клеточного иммунитета, секретирующими ИЛ-10 и TGF β . Показана их важная роль в защите мозга от долговременных последствий повреждения в моделях инсульта, депрессии, травмы и эпилепсии. Th2-лимфоциты являются основными индукторами гуморального иммунитета при помощи секреции ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-13. Как правило, они взаимодействуют с МНС2 на поверхности В-клеток. Они подавляют активность Th1-лимфоцитов и активируют синтез антител В-лимфоцитами. Таким образом, они могут выступать в качестве противовоспалительных агентов применительно к воспалению в центральной нервной системе [21].

Важно подчеркнуть, функционирование Трег клеток имеет особенность, которая была описана на культивируемых клетках, а также *in vivo*. Эта особенность заключается в том, что при определенных условиях противовоспалительные Трег клетки могут терять свой фенотип и превращаться в клетки, секретирующие провоспалительные факторы. Возможность такой трансформации была показана не только у животных, но и при патологиях у человека [22]. Необходимо отметить также, что часто говорят не просто об утрате противовоспалительного и обретении провоспалительного фенотипа у Трег клеток, а об их трансформации в Th17 клетки, причем эта трансформация может носить обратимый характер [22].

Вопрос о наличии Т-хелперов непосредственно в ткани мозга остается предметом для дискуссии [23], поскольку для функциональной активации Т-хелперов необходим непосредственный контакт рецептора TCR на поверхности лимфоцита с комплексом МНС2 на мембране макрофага или клетки микроглии и представленным на нем антигеном. Известно, что под действием ИЛ-10 в мозге снижалась экспрессия МНС2, что может быть признаком снижения интенсивности презентации антигенов в ходе реализации противовоспалительной программы. Этот факт может служить косвенным доводом в пользу возможности миграции Т-хелперов в паренхиму головного мозга [24]. В то же время, показано, что в ЦНС мышей неизвестная субпопуляция Т-лимфоцитов была критически важна для нормализации поведения в ходе выздоровления в модели индукции депрессивно-подобного поведения однократным введением ЛПС. При этом, лимфоциты не являются основным источником ИЛ-10 в ткани головного мозга этих мышей [25]. В настоящее время известна возможность регуляции проницаемости ГЭБ для лимфоцитов при помощи цитокинового фона, в частности, при помощи IFN β [26]. Этот факт позволяет предположить возможность локального повышения проницаемости ГЭБ для лимфоцитов непосредственно в зоне нейровоспалительного процесса, к которому они могут добираться по градиенту хемокинов по со-

судам кровеносной сети. В то же время присутствие Т-хелперов в оболочках головного мозга и в сосудистом сплетении не подвергается сомнению [27]. Поскольку паутинная оболочка непосредственно прилежит к поверхности коры полушарий и гиппокампу и через нее проходят питающие мозг кровеносные сосуды, то лимфоциты из периваскулярного пространства паутинной оболочки могут секретировать различные регуляторные белки, в том числе и цитокины, в локальный мозговой кровоток или уходить в циркуляцию по кровеносным сосудам головного мозга. Кроме того, показана возможность прямой диффузии цитокинов из оболочки мозга в кору больших полушарий [28].

Как указано выше, классическое распознавание антигена Т-клетками основывается на распознавании пептида в комплексе с МНС. В 2000-х гг. была открыта способность ряда минорных субпопуляций Т-клеток распознавать липиды, экспонированные в комплексе с белками семейства CD1 на поверхности АПК. Наиболее изучены 2 субпопуляции Т-клеток, относящиеся к конкретным клонотипам. Первая – популяция $\gamma\delta$ -клеток, имеющая генотип V δ 1 и участвующая в защите эндотелия от инфекций. Эти клетки могут экспрессировать различные цитокины в зависимости от микроокружения. Основными цитокинами являются провоспалительные ИЛ-17 и ИФН γ , но под действием ИЛ-4 *in vitro* они начинают секретировать противовоспалительный ИЛ-10 [29]. Вторая субпопуляция – так называемые NKT-клетки, имеющие у человека TCR V α 24-J α 18. Эти клетки одновременно несут маркер CD56, не характерный для классических лимфоцитов, но экспрессируют общий Т-клеточный маркер CD3 и функционально подобны классическим Т-лимфоцитам. Они могут нести CD4 и CD8 на поверхности (или не нести оба) и функционально подобны классическим Т-лимфоцитам. Они могут нести CD4 и CD8 на поверхности и функционировать подобно Т-киллерам и Т-хелперам [30, 31]. В отличие от классических Т-лимфоцитов, NKT-клетки способны ингибировать активность Т-киллеров в ходе непосредственного контакта, без секреции цитокинов в среду [32]. Было показано, что NKT-клетки присутствуют в ЦСЖ и, по-видимому, могут участвовать в развитии патологий ЦНС [33].

Исследование Т-клеточных субпопуляций, находящихся у людей в оболочках головного мозга и сосудистых сплетениях ЦНС, не представляется возможным по этическим соображениям, поэтому основными клетками, которые исследуют при различных патологиях нервной системы остаются клетки, находящиеся в ЦСЖ спинного мозга. Основными иммунными клетками, находящимися в ликворе центрального канала спинного мозга, являются Т-клетки, причем большую их часть составляют CD4-положительные Т-хелпе-

ры [34–36]. В ряде работ показано, что субпопуляция Т-клеток ликвора по репертуару Т-клеточных рецепторов существенно отличается от Т-клеток крови и, по всей видимости, имеет специфичность к антигенам, имеющим отношение к нервной системе. Между кровью и ликвором постоянно происходит обмен Т-клетками. Основной обмен происходит в лептоменингеальном пространстве и в хороидном сплетении, причем в норме у мышей для диффузии меченных клеток из крови в ткань мозга достаточно 2 ч, однако, накопление в ткани ЦНС Т-клеток, имеющих рецептор к ЦНС-специфичному антигену, происходит медленнее и может занять около 24 ч [37]. Основную группу Т-клеток в ЦСЖ составляют клетки памяти, в то время как в крови большую часть CD4- и CD8-лимфоцитов составляют naive клетки [36, 38].

На основании того, что Т-клетки могут выступать в качестве регуляторов воспалительного процесса, предполагается, что в основе развития некоторых нейродегенеративных, а также неврологических заболеваний может лежать появление или гибель определенных субпопуляций Т-клеток, имеющих Т-клеточные рецепторы (TCR) к некоторым специфическим для нервной системы антигенам.

ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ПОЛИНЕВРОПАТИИ

Воспалительные полиневропатии – это приобретенные заболевания в основном периферических нервов, которые могут возникать в любом возрасте; полиневропатии можно подразделить на острые и хронические. Острые формы полиневропатий развиваются и стихают в течение 4 нед., в то время как хронические формы могут продолжаться в течение 8 или более нед. Наиболее распространенная форма острой воспалительной полиневропатии – это синдром Гийена–Барре. Наиболее распространенной формой хронической воспалительной полиневропатии является хроническая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия (ХВДП).

ХВДП – это клинически гетерогенная иммуноопосредованная периферическая нейропатия, имеющая прогрессирующее или рецидивирующее-ремиттирующее течение [39]. Основными симптомами ХВДП являются слабость в конечностях, ухудшение чувствительности и демиелинизация периферических (сенсорных и моторных) нервов. Основной терапией ХВДП является подавление функции иммунитета с помощью кортикостероидов, внутривенного введения иммуноглобулинов, и плазмафереза. Универсальной терапии не существует, и разные пациенты отвечают на разные виды терапии; до 20% пациентов не отвечает ни на один из видов упомянутой терапии [39].

В настоящее время выделяют типичные и атипичные формы ХВДП [1, 40]. Типичная форма ХВДП характеризуется симметричной полиневропатией, которая захватывает как проксимальные так и дистальные части конечностей и может захватывать как преимущественно сенсорные, так и преимущественно моторные нервы, а также оба типа нервов. Атипичная форма ХВДП включает в себя несколько дополнительных подтипов (в скобках указано сокращенное английское название):

1. Дистальная симметричная приобретенная полинейропатия (DADS);
2. Мультифокальная демиелинизирующая сенсорная и моторная нейропатия (MADSAM);
3. Редкая хроническая атаксическая нейропатия, ассоциированная с офтальмоплегией, IgM парапротеинами, холодовыми агглютинаинами и антителами к дисиалосилу (CANOMAD).

Механизмы, инициирующие различные формы ХВДП, остаются до сих пор неизвестными, хотя в некоторых случаях есть данные о заболеваниях, перенесенных незадолго до развития ХВДП. Так, было показано, что в ряде случаев перенесенные вирусные инфекции могут предшествовать развитию ХВДП [41]. В ряде случаев ХВДП коморбидна с сахарным диабетом или с моноклональной гаммапатией [42], однако, несмотря на эти данные, факторы, провоцирующие ХВДП, остаются неизвестными.

Синдром Гийена–Барре (СГБ) – это острая воспалительная демиелинизирующая полиневропатия и по своей симптоматике в значительной степени схожа с ХВДП. В отличие от ХВДП, СГБ очень часто ассоциирует с различными вирусными и бактериальными заражениями, которые провоцируют формирование либо кросс-реактивных антител с аутоиммунными свойствами либо кросс-реактивных Т-клеток, узнающих некоторый ауто-антиген [43]. В ряде случаев описано развитие СГБ после черепно-мозговой травмы или хирургического вмешательства [44]. В клинической практике дифференциальная диагностика ХВДП и СГБ зачастую может быть проблемной и постановка точного диагноза может требовать длительного наблюдения врачей [45]. Несмотря на ярко выраженную аутоиммунную картину патогенеза, терапия стероидными препаратами при СГБ противопоказана, в отличие от ХВДП [45], что указывает на существенно отличные механизмы, вовлеченные в патогенез этих двух заболеваний. В большинстве случаев удается идентифицировать вирус или бактерии, спровоцировавшие развитие СГБ. Среди них такие распространенные вирусы, как вирус герпеса, цитомегаловирус, вирус Эпштейна–Барра и др. [43], однако, до сих пор остаются непонятными факторы, способствующие возникновению СГБ лишь у некото-

рых людей. По крайней мере, для части микроорганизмов, провоцирующих СГБ показано, что они индуцируют активацию адаптивного иммунитета и формирование Т- и В-лимфоцитов против антигенов атаковавшего микроорганизма. Однако в ряде случаев оказывается, что либо ТCR либо антитела, сформированные против чужеродного антигена, имеют кросс-реактивность с белками или липидами самого организма, что провоцирует развитие аутоиммунной реакции, приводящей к нарушению функций периферической нервной системы [43]. Существуют данные о том, что фактором, способствующим формированию кросс-реактивных ТCR, является специфический аллельный набор главного комплекса гистосовместимости либо белков семейства CD1, ответственных за презентацию липидных антигенов [43]. Однако данных для окончательного вывода об ассоциации определенного типа антиген-презентирующих белковых комплексов и развитием СГБ в настоящее время недостаточно.

УЧАСТИЕ Т-КЛЕТОК В РАЗВИТИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПОЛИНЕВРОПАТИЙ

Исследования Т-клеток крови при СГБ показали, что, несмотря на то, что основным иммунным элементом патогенеза СГБ считается гуморальный иммунитет, в ряде случаев наблюдается клональная экспансия Т-клеток [46], причем не только $\alpha\beta$ -клеток, но и $\gamma\delta$ -клеток [47]. Исследование субпопуляций Т-клеток в крови во время прогрессирования заболевания показало, что при СГБ доля CD4- и CD8-положительных Т-клеток в крови меняется в зависимости от инфекции, вызвавшей СГБ. Однако наиболее типичные изменения в составе клеток во время фазы прогрессирования заболевания включали в себя увеличение доли активированных CD8 клеток и провоспалительных CD4/CD29-положительных клеток, а также снижение доли наивных CD4 клеток [48]. Ниже мы увидим, что изменения наблюдаются также в ЦСЖ.

Исследования различных компонентов адаптивного клеточного иммунитета показали, что ХВДП сопровождается клональной экспансией Т-киллеров в крови [49, 50]. Важно отметить, что вывод о клональной экспансии делался на основе спектра типирования V-региона β -цепи Т-клеточного рецептора, как обеспечивающего основное разнообразие Т-клеточного рецептора у $\alpha\beta$ -клеток. Анализа варибельной части альфа цепи, а также гамма и дельта цепей не проводилось. Несмотря на то, что клональная экспансия наблюдается в основном среди Т-киллеров, изменения наблюдаются также и в популяции Т-хелперов. Количественная оценка числа Т-хелперов выявила существенный рост числа Т-хелперов в крови у пациентов с ХВДП, при этом число Т-киллеров

не меняется [51]. Таких изменений, однако, не было обнаружено в другом исследовании [52]. Важно отметить, что разделение пациентов на группы по форме ХВДП в упомянутых исследованиях не проводилось. Последующие исследования [53, 54] уже разделяли пациентов по формам заболевания и показали, что при атипичных формах ХВДП увеличивается число Т-клеток в крови, причем происходит это за счет увеличения числа Т-хелперов, в то время как при типичной форме ХВДП таких изменений не наблюдается [53], что подтверждает данные работы [52]. Кроме того, было показано, что ХВДП сопровождается ослаблением иммуносупрессорной функции Трег-клеток [52, 55], причем фазы обострения ХВДП сопровождались снижением числа Трег-лимфоцитов в крови [55]. Описанные выше изменения Т-клеточной компоненты адаптивного иммунитета носят неспецифический характер. Однако были обнаружены также специфические изменения, а именно появление Т-клеток, реагирующих на компоненты миелиновых оболочек P0 и MBP, а также белок Neurofascin, участвующий в формировании перехвата Ранвье [54]. Последнее является очень существенной деталью, поскольку часть патологий, которые раньше относили к ХВДП, недавно решено было выделить в отдельную группу – аутоиммунные нодопатии, и одним из важных диагностических критериев для отнесения к этой группе является наличие антител к белкам перехвата Ранвье, в том числе к Neurofascin [56].

Все перечисленные исследования включали в себя только Т-клетки, выделенные из крови. В ряде работ также проводился анализ Т-клеток в биопсии периферических нервов при СГБ и ХВДП. Эти работы показали, что отсутствует значимая корреляция между регистрируемыми неврологическими нарушениями и количеством иммунных клеток, обнаруженных в биопсии икроножного нерва [57–59]. Кроме того, было показано, что наряду с $\alpha\beta$ -клетками у некоторых пациентов происходит значимое накопление $\gamma\delta$ -клеток, причем это накопление характерно не только для ХВДП и СГБ, но и других заболеваний [57]. Также было обнаружено, что в биопсиях нервов при ХВДП наблюдается клональная экспансия CD8-положительных Т-клеток [49], а также в ряде случаев появляются НКТ-клетки [31]. Вообще говоря, на основе результатов, полученных на биопсии икроножного нерва, сделать какие-либо значимые выводы о патогенезе обсуждаемых заболеваний представляется очень проблематичным, поскольку наиболее сильным изменениям подвергается не этот нерв, а нервные корешки, выходящие из спинного мозга, и в настоящий момент сложно сказать насколько Т-клетки, обнаруженные в икроножном нерве, обладают специ-

фичностью к тем же антигенам, что и Т-клетки в корешках спинного мозга.

Как уже отмечалось выше, ХВДП и СГБ сопровождаются повышением уровня ряда цитокинов (CXCL10, CCL7, IL8, IL1 α , BAFF) в ЦСЖ [7, 60]. CXCL10 является мощным активатором функции Т-клеток [61], и как CCL7 и IL8 (CXCL8) относится к ряду провоспалительных цитокинов [62], поэтому можно было бы ожидать изменений в состоянии Т-клеток в ликворе. Единственная опубликованная к настоящему моменту работа, в которой анализировался клеточный состав в ликворе при СГБ и ХВДП – это работа [33]. В ней показано, что при ХВДП и СГБ наблюдаются схожие изменения в ликворе – повышение концентрации белка, повышение проницаемости ГЭБ (или, точнее, повышение уровня альбумина в ЦСЖ с пропорциональным повышением уровня иммуноглобулинов). Авторам удалось обнаружить значимое отличие между ХВДП и СГБ – увеличение доли НКТ клеток в ликворе при ХВДП. По мнению авторов, многофакторное сравнение, учитывающее долю НКТ клеток, долю Т-клеток, и долю моноцитов в ликворе может лечь в основу создания диагностического критерия, позволяющего отличить ХВДП от СГБ. Данное предложение, как отмечают сами авторы, требует дальнейших подтверждений, поскольку СГБ и ХВДП представляют собой очень гетерогенный набор патологий с несколькими стадиями течения заболевания и остается неясным, какой стадии каждого заболевания, а также моменту с начала заболевания, соответствуют обнаруженные зависимости. Необходимо отметить, что НКТ клетки имеют Т-клеточный рецептор для распознавания гликолипидов и увеличение их доли в ликворе при ХВДП может косвенно указывать на возможный элемент патогенеза данного заболевания, однако, остается все же непонятным, что может выступать в качестве возможного патогена, индуцирующего формирование Т-клеточного рецептора с аутоиммунной кросс-реактивностью, приводящей к формированию заболевания. В связи с тем, что изменения в клеточном составе ЦСЖ при СГБ и ХВДП ярко выражены, можно предполагать, что при этих патологиях также могут меняться характеристики и клональность Т-клеток ликвора, однако, эти параметры до сих пор не анализировались.

Важным отличием СГБ от ХВДП является то, что СГБ является монофазным заболеванием и при лечении наблюдается постепенное улучшение, в то время как ХВДП может прогрессировать либо характеризоваться рецидивирующе-ремиттирующим течением. Несмотря на то, что аутоиммунная природа обоих заболеваний не вызывает сомнений, факторы, определяющие разницу в характере течения заболевания не ясны. В работах, посвященных патогенезу СГБ и ХВДП

предполагают, что провоцирующий фактор, как правило, инфекционное заболевание, приводит к формированию клона Т- или В-клеток, кросс-специфичных не только к антигенам патогена, но и к аутоантигенам. Однако возможен и альтернативный путь патогенеза, не оцененный в экспериментальных работах. Известно, что в крови здоровых людей достаточно часто находят клетки, специфичные к аутоантигенам-мишеням при СГБ и ХВДП, например, к МВР [63]. Более того, в исследованиях на животных показано, что Т-клетки, специфичные к другому иммуногенному аутоантигену миелина MOG, критически важны для формирования долговременной памяти [64]. Это позволяет предположить, что такие клетки либо осуществляют трофическую поддержку функционирования нервов [65], либо, являясь Treg, превентивно защищают нервы от возможных атак иммунной системы. В случае вторжения патогена эти клетки, распознавая сходные антигены, могут изменить свой фенотип и, как следствие спектр выделяемых цитокинов.

Можно предположить, что одним из факторов, предрасполагающих к неуклонному прогрессированию ХВДП, может являться трансформация Treg клеток в провоспалительные Т-клетки, особенно Th17. Схожая ситуация возможна и при рецидивирующем течении, когда возникновение рецидива может быть результатом той же самой трансформации. Известна возможность трансдифференцировки Treg в Th17 и Th17 в Treg под действием различных субпопуляций макрофагов *ex vivo* [66]. Можно предположить, что различные субпопуляции макрофагов могут получать неодинаковую трофическую поддержку в условиях инфекционной провокации, что может приводить к появлению макрофагов, способствующих трансдифференцировке Т клеток. Последнее может приводить к изменению характера иммунной компоненты патологического процесса и развитию либо интенсивного воспаления, либо, наоборот, фазы ремиссии.

Еще одним возможным патологическим механизмом развития и прогрессирования ХВДП может являться взаимный антагонизм между Treg и НКТ-клетками. Данный антагонизм показан для аллергической астмы – другого аутоиммунного заболевания, также, поддающегося терапии кортикостероидами. Nguyen и др. показали *ex vivo* прямую и специфическую цитотоксичность CD4⁺-НКТ-клеток по отношению к Treg, что может приводить к снижению функциональной активности и количества Treg у пациентов. Более того, эта цитотоксичность была повышена у пациентов с аллергической астмой по сравнению с неаллергической астмой и здоровым контролем и снижалась под действием кортикостероидов [67]. Существуют данные и об обратном эффекте – подавлении функциональности НКТ-клеток под

действием Трег [68]. В отличие от СГБ, ХВДП характеризуется увеличением представленности НКТ-клеток в ЦСЖ пациентов [33]. По-видимому, колебания равновесия между активностью НКТ- и Трег-клеток также могут лежать в основе ремитирующего течения заболевания. Можно предположить, что CD4⁺-НКТ-клетки не участвуют в патогенезе СГБ, что объясняет устойчивость этой патологии к кортикостероидам. К сожалению, данные о взаимных прямых взаимодействиях НКТ-клеток и Трег при ХВДП и СГБ не описаны в литературе.

Как мы описали выше СГБ и ХВДП являются очень гетерогенными группами заболеваний, из которых, скорее всего, при дальнейших исследованиях удастся выделить группы заболеваний с четкими критериями для диагностики (как, например, вышеупомянутые нодопатии). Для выявления возможных диагностических критериев, а также мишеней для терапии при данных заболеваниях необходимо учитывать следующий набор факторов:

- (1) агент, индуцировавший заболевание,
- (2) TCR и/или В-клеточный рецептор (антитело), связывающийся с патогеном и обладающий потенциальной кроссреактивностью,
- (3) вариант HLA и CD1 у пациента.

При наличии такой информации возможно создание терапии, направленной на селективное подавление Т- и В-клеток, несущих рецептор, обладающий кросс-реактивностью.

БАС

Боковой амиотрофический склероз является клинически гетерогенным заболеванием и по некоторым симптомам схож с ХВДП (например, слабость в конечностях), однако, имеет ряд признаков, позволяющих отделить его от ХВДП (например, появление патологических рефлексов) [69]. Тем не менее, ХВДП может быть в ряде случаев неверно диагностирована как боковой амиотрофический склероз, несмотря на существенную разницу в патогенезе и течении этих заболеваний [70]. БАС, по всей видимости, является гетерогенной группой заболеваний, поскольку для нее описаны семейные формы, ассоциированные с точечными мутациями в генах SOD1, C9orf72, TARDBP, FUS, и т.д. [71], однако, подавляющее большинство случаев сейчас все-таки рассматривается как спорадические.

Течение БАС безусловно включает в себя иммунную компоненту (повышение уровня С реактивного белка, уровня иммуноглобулинов в крови [72], а также уровня белков острой фазы в сыворотке пациентов [73], и появление окисленных белков в сыворотке крови [74]). Однако, эти изменения часто относят к реакции иммунной си-

стемы на отмирающую ткань нервной системы и не рассматривают как первичное звено патогенеза БАС. Более того, БАС практически не рассматривается как заболевание, патогенез которого вовлекает иммунитет, поскольку терапия с помощью иммуносупрессантов не оказывает никакого влияния на течение заболевания [2]. Анализ Т-клеточной компоненты иммунитета показал, что при БАС повышается доля активированных Т-хелперов и Т-киллеров как в крови так и ЦСЖ, причем предполагается, что активация Т-хелперов в ЦСЖ происходит именно в спинномозговом канале, а не за счет диффузии активированных Т-клеток в ликвор [75]. Кроме того, при БАС выявили достаточно необычные изменения — уменьшение доли регуляторных Т-клеток среди общей субпопуляции Т-клеток [76, 77], причем было обнаружено, что у пациентов с БАС снижены иммуносупрессорные свойства Трег клеток [78]. Общее число Трег клеток в крови при этом могло как падать [77, 79], так и не меняться [80]. Здесь необходимо сделать одно важное отступление о данных, полученных на мышах с мутацией G93A в гене SOD1, обнаруженной у больных с семейной формой БАС. На этих животных было показано, что возникновение патологии, схожей с БАС, сопровождается сначала увеличением числа Трег клеток, а затем снижением числа этих клеток [79]. Эти данные наводят на мысль о том, что в зависимости от стадии БАС у пациентов может также наблюдаться разное число Трег в крови. Поиск корреляции у пациентов между скоростью прогрессирования заболевания и числом Трег выявил обратную корреляцию между этими параметрами, указывая на то, что Трег клетки могут играть важную роль в патогенезе БАС и тормозить развитие патологии [77, 79]. Важно отметить, что среди Трег клеток значимое снижение числа происходило в субпопуляции эффекторных Трег клеток (CD45RO⁺) [77]. Возвращаясь в данный, полученный на трансгенных мышах с семейной мутацией, можно также отметить, что инъекции И-2с этим мышам приводили к экспансии эффекторных Трег клеток, которые затем накапливались в вентральных рогах спинного мозга, что сопровождалось замедлением прогрессирования заболевания [77]. Существуют данные о том, что защитный эффект могут обладать не только Трег клетки, но и везикулы, секретируемые этими клетками [81]. Эти данные послужили основой для создания Трег терапии БАС.

Клинические испытания подхода, направленного на увеличение доли аутологических Т-клеток в крови у пациентов с БАС, показали положительный результат [82, 83], причем Трег терапия замедляла повышение уровня белков острой фазы, а также снижала уровень окисленных белков в сыворотке крови [74]. Для начала необходимо отметить, что обнаруженный положительный эф-

фект лечения с помощью аутологичных Трег клеток не является очень однозначным, что отмечают даже сами авторы [83], поскольку в случае быстро прогрессирующего БАС, сопровождающегося сильным повышением уровня провоспалительных цитокинов, терапия не имела явного эффекта. Возможно, что как и при других заболеваниях, характеризующихся сильной гетерогенностью, Трег терапия может быть эффективной только в ряде случаев, однако, конкретные критерии включения пациентов с БАС для анализа терапии пока не ясны.

Важно также отметить, что Трег терапия влияла на интенсивность течения воспаления [74], что ставит под вопрос интерпретацию данных об активации иммунитета при БАС всего лишь как о реакции организма на протекающий дегенеративный процесс. Тот факт, что подавление иммунной реакции с помощью Трег, но не с помощью стероидных средств, может замедлять течение БАС указывает на возможный элемент патогенеза БАС, который зависит от иммунитета. В данном случае речь идет о том, что неселективное подавление воспалительной реакции неэффективно, а восстановление иммуносупрессорных свойств и увеличение числа иммуносупрессорных Трег клеток может оказывать положительный эффект. Последнее говорит о избирательности, которая необходима для достижения положительного эффекта и чем эта избирательность может быть обусловлена в настоящий момент не ясно. Предположительно, избирательность может определяться TCR некоторых Трег клеток, которые за счет специфического рецептора могут находить необходимую нишу в организме, в которой важно остановить воспалительный процесс или за счет секреции некоторых цитокинов активировать процесс, препятствующий нейродегенерации. Если принципиальным моментом является ингибирование воспаления, то альтернативным вариантом для Трег терапии может быть поиск воздействий, восстанавливающих угнетенную функцию Трег клеток и/или сдвигающих баланс Th17/Трег в сторону Трег клеток. Однако в настоящее время фармакологические агенты или другие терапевтические воздействия, способные выполнять указанные функции в организме, неизвестны. В любом случае, если участие Трег клеток в патогенезе БАС подтвердится дальнейшими исследованиями, необходим поиск TCR, ответственных за развитие положительного эффекта Трег терапии, а также поиск ассоциаций между TCR и аллельными вариантами MHC, для разработки персональной терапии для каждого пациента с БАС.

Причины, вызывающие снижение доли и функциональности Трег в периферической крови и, вероятно, в ЦСЖ [84] пациентов с БАС остаются неизвестными. В ряде работ одновременно со

снижением представленности Трег наблюдали повышение доли НК- и НКТ-клеток в периферической крови пациентов [80, 85]. У мышей, несущих мутантную супероксиддисмутазу (генетическая модель БАС) и у пациентов с БАС, было обнаружено проникновение НК-клеток в спинной мозг. Кроме того, у мышей было обнаружено зависимость от НК-клеток и IFN γ снижение проникновения Трег в спинной мозг и экспрессии мРНК *Foxp3* – ключевого транскрипционного фактора Трег [86]. К сожалению, авторы данной работы ограничились изучением НК-клеток, принадлежащих к неспецифической иммунной системе, несмотря на то, что использовали антитела к CD3 для негативной сортировки НК-клеток и антитела к неспецифическому для НК/НКТ маркеру NK1.1 [87] для удаления НК клеток. Последнее не позволяет утверждать, что НКТ-клетки не участвуют в обнаруженном эффекте. Таким образом, несмотря на то, что БАС и ХВДП являются разными патологиями, изменения в уровне некоторых подтипов Т-клеток очень схожи и это может указывать на некоторый общий элемент в развитии этих патологий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашем обзоре мы рассмотрели несколько неврологических заболеваний, каждое из которых фактически является также группой заболеваний с внешне схожей симптоматикой. Хотя в случае рассмотренных невропатий существуют универсальные терапевтические подходы, способные улучшить состояние пациентов, накопленные данные о патогенезе этих заболеваний говорят о том, что излечение, с высокой вероятностью, возможно только при персонализированном иммунологическом подходе. Суммированные нами данные говорят о том, что СГБ, ХВДП и БАС, несмотря на большие различия в патогенезе, имеют общий элемент в патогенезе, который адресует к характерным изменениям в специфическом иммунитете. Эти изменения включают в себя либо появление аутоиммунных Т- и/или В-клеток (СГБ, ХВДП) либо подавление функции Трег клеток и увеличение числа НКТ-клеток (ХВДП, БАС). В любом случае речь идет о клетках, обладающих специфичностью к аутоантигенам, и, в зависимости, от патологии это могут быть как про- так и противовоспалительные клетки. Скорее всего, разработка диагностики и терапии рассмотренных заболеваний потребует длительного накопления иммунологических данных, включая аллельные варианты не только MHC, но и CD1, данных о микробиоте пациентов, и, конечно, данных об ассоциациях между последовательностью TCR и MHC. Эти данные должны в себя включать, по всей видимости, не только последовательности, но и принадлежность Т-клетки к од-

ной из субпопуляций для более легкой идентификации клеток, на которые должна быть направлена терапия.

Возникший в нашем обзоре аспект, касающийся трансформации Трег клеток и, если говорить более широко, изменение фенотипа Т-клеток, может указывать на некий общий механизм развития рецидивов заболеваний, включая не только ХВДП, но и рассеянный склероз и множество других заболеваний, не относящихся к нервной системе. Возможно, что одним из аспектов старения является медленное накопление аутоиммунных Т-клеток с неустойчивым фенотипом, которые при изменении гормонального фона или других факторов в организме может приводить к развитию нескольких очагов воспаления и увеличению нагрузки на иммунную систему и организм, усугубляя тем самым течение патологии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Автономной некоммерческой организаций “Московский центр инновационных технологий в здравоохранении” 0408-1/22 (договор 0408-1/22-1НИР).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

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

Информированное согласие. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Супонева Н.А., Наумова Е.С., Гнедовская Е.В. // Нервно-мышечные болезни. 2016. V. 6. № 1. P. 44–53.
2. Malaspina A., Puentes F., Amor S. // Int. Immunol. 2015. V. 27. № 3. P. 117–129.
3. Хакимова А.Р., Попова Н., Якупов Э. // Вестник современной клинической медицины. 2014. V. 7. № 2. P. 183–187.
4. Кантимирова Е., Шнайдер Н. // Вестник КБ № 51. 2009. V. 3. № 7. P. 24–27.
5. Бакулин И.С., Закройщикова И.В., Супонева Н.А., Захарова М.Н. // Нервно-мышечные болезни. 2017. V. 7. № 3. P. 10–20.
6. Roggenbuck J.J., Boucraut J., Delmont E., Conrad K., Roggenbuck D. // Ann. Transl. Med. 2018. V. 6. № 17. P. 337–337.
7. Krause K., Wulf M., Sommer P., Barkovits K., Vorgerd M., Marcus K., Eggers B. // Diagnostics. 2021. V. 11. № 9. P. 1522.
8. Bourque P.R., Brooks J., Warman-Chardon J., Breiner A. // J. Neurol. 2020. V. 267. № 3. P. 746–751.
9. Zarif H., Nicolas S., Guyot M., Hosseiny S., Lazzari A., Canali M.M., Cazareth J., Brau F., Golzner V., Dourneau E., Maillaut M., Luci C., Paquet A., Lebrigand K., Arguel M.J., Daoullarian D., Heurteaux C., Gleichenhans N., Chabry J., Guyon A., Petit-Paitel A. // Brain. Behav. Immun. 2018. V. 69. P. 235–254.
10. Bassing C.H., Swat W., Alt F.W. // Cell. 2002. V. 109. P. S45–55.
11. Bhattacharyya N.D., Feng C.G. // Front. Immunol. 2020. V. 11. P. 624.
12. Abualrous E.T., Sticht J., Freund C. // Curr. Opin. Immunol. 2021. V. 70. P. 95–104.
13. Radwan J., Babik W., Kaufman J., Lenz T.L., Winternitz J. // Trends Genet. 2020. V. 36. № 4. P. 298–311.
14. Naito T., Okada Y. // Semin. Immunopathol. 2022. V. 44. №1. P. 15–28.
15. Wo J., Zhang F., Li Z., Sun C., Zhang W., Sun G. // Front. Immunol. 2020. V. 11. P. 2740.
16. Vantourout P., Hayday A. // Nat. Rev. Immunol. 2013. 132. V. 13. № 2. P. 88–100.
17. Sijts E.J.A.M., Kloetzel P.M. // Cell Mol. Life Sci. 2011. V. 68. № 9. P. 1491–1502.
18. Veroni C., Aloisi F. // Front. Immunol. 2021. V. 12. P. 665718.
19. Fransen N.L., Hsiao C.C., Van Der Poel M., Engelenburg H.J., Verdaasdonk K., Vincenten M.C.J., Remmerswaal E.B.M., Kuhlmann T., Mason M.R.J., Hamann J., Smolders J., Huitinga I. // Brain. 2020. V. 143. № 6. P. 1714–1730.
20. Smolders J., Heutinck K.M., Fransen N.L., Remmerswaal E.B.M., Hombrink P., ten Berge I.J.M., van Lier R.A.W., Huitinga I., Hamann J. // Nat. Commun. 2018. V. 9. № 1.
21. Wang S., Zhang H., Xu Y. // Neurol. Res. 2016. V. 38. № 6. P. 495–503.
22. Lee W., Lee G.R. // Exp. Mol. Med. 2018. V. 50. № 3.
23. Lopes Pinheiro M.A., Kooij G., Mizze M.R., Kamermans A., Enzmann G., Lyck R., Schwaninger M., Engelhardt B., de Vries H.E. // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1862. № 3. P. 461–471.
24. Zhou K., Zhong Q., Wang Y.-C., Xiong X.-Y., Meng Z.-Y., Zhao T., Zhu W.-Y., Liao M.-F., Wu L.-R., Yang Y.-R., Liu J., Duan C.-M., Li J., Gong Q.-W., Liu L., Yang M.-H., Xiong A., Wang J., Yang Q.-W. // J. Cereb. Blood Flow Metab. 2017. V. 37. № 3. P. 967–979.
25. Laumet G., Edralin J.D., Chiang A.C.A., Dantzer R., Heijnen C.J., Kavelaars A. // Neuropsychopharmacology. 2018. V. 43. № 13. P. 2597–2605.
26. Prat A., Biernacki K., Antel J.P. // J. Autoimmun. 2005. V. 24. № 2. P. 119–124.
27. Radjavi A., Smirnov I., Derecki N., Kipnis J. // Mol. Psychiatry 2014. V. 19. № 5. P. 531–533.
28. Wu Z., Zhang J., Nakanishi H. // J. Neuroimmunol. 2005. V. 167. № 1–2. P. 90–98.
29. Mao Y., Yin S., Zhang J., Hu Y., Huang B., Cui L., Kang N., He W. // Cell. Mol. Immunol. 2016. V. 13. № 2. P. 217–228.
30. Almeida J.S., Casanova J.M., Santos-Rosa M., Tarazona R., Solana R., Rodrigues-Santos P. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. № 3. P. 2743.

31. Illés Z., Kondo T., Newcombe J., Oka N., Tabira T., Yamamura T. // *J. Immunol.* 2000. V. 164. № 8. P. 4375–4381.
32. Terrazzano G., Bruzzaniti S., Rubino V., Santopaolo M., Palatucci A.T., Giovazzino A., La Rocca C., de Candia P., Puca A., Perna F., Procaccini C., De Rosa V., Porcellini C., De Simone S., Fattorusso V., Porcellini A., Mozzillo E., Troncone R., Franzese A., Ludvigsson J., Matarese G., Ruggiero G., Galgani M. // *Nat. Metab.* 2020. V. 2. № 2. P. 142–152.
33. Heming M., Schulte-Mecklenbeck A., Brix T., Wolbert J., Ruland T., Klotz L., Meuth S.G., Gross C.C., Wiendl H., Meyer Zu Hörste G. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. № MAR. P. 515.
34. Schulte-Mecklenbeck A., Kleffner I., Beuker C., Wirth T., Hartwig M., Schmidt-Pogoda A., Klotz L., Hansen W., Wiendl H., Meuth S.G., Gross C.C., and Minnerup J. // *Eur. J. Neurol.* 2019. V. 26. № 6. P. 919–926.
35. Mix E., Olsson T., Correale J., Kostulas V., Link H. // *Scand. J. Immunol.* 1990. V. 31. № 4. P. 493–501.
36. Pappalardo J.L., Zhang L., Pecsok M.K., Perlman K., Zografou C., Raddassi K., Abulaban A., Krishnaswamy S., Antel J., van Dijk D., Hafler D.A. // *Sci. Immunol.* 2020. V. 5. № 51.
37. Carrithers M.D., Visintin I., Kang S.J., Janeway C.A. // *Brain.* 2000. V. 123. № 6. P. 1092–1101.
38. Kivisäkk P., Trebst C., Liu Z., Tucky B.H., Sørensen T.L., Rudick R.A., Mack M., Ransohoff R.M. // *Clin. Exp. Immunol.* 2002. V. 129. № 3. P. 510–518.
39. Гапешин Р.А., Баранцевич Е.Р., Руденко Д.И., Посохина О.В., Стучевская Т.Р. // Ученые записки СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова 2019. V. 26. № 1. P. 9–19.
40. Lehmann H.C., Burke D., Kuwabara S. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2019. V. 90. № 9. P. 981–987.
41. Doneddu P.E., Bianchi E., Cocito D., Manganelli F., Fazio R., Filosto M., Mazzeo A., Cosentino G., Cortese A., Jann S., Clerici A.M., Antonini G., Siciliano G., Luigetti M., Marfia G.A., Briani C., Lauria G., Rosso T., Cavaletti G., Carpo M., Benedetti L., Beghi E., Liberatore G., Santoro L., Peci E., Tronci S., Cotti Piccinelli S., Toscano A., Piccolo L., Verrengia E.P., Leonardi L., Schirinzi E., Mataluni G., Ruiz M., Dacci P., Nobile-Orazio E. // *Eur. J. Neurol.* 2020. V. 27. № 1. P. 136–143.
42. Doneddu P.E., Cocito D., Manganelli F., Fazio R., Briani C., Filosto M., Benedetti L., Bianchi E., Jann S., Mazzeo A., Antonini G., Cosentino G., Marfia G.A., Cortese A., Clerici A.M., Carpo M., Schenone A., Siciliano G., Luigetti M., Lauria G., Rosso T., Cavaletti G., Beghi E., Liberatore G., Santoro L., Spina E., Peci E., Tronci S., Ruiz M., Cotti Piccinelli S., Verrengia E.P., Gentile L., Leonardi L., Mataluni G., Piccolo L., Nobile-Orazio E. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2020. V. 91. № 10. P. 1092–1099.
43. Rodríguez Y., Rojas M., Pacheco Y., Acosta-Ampudia Y., Ramírez-Santana C., Monsalve D.M., Gershwin M.E., Anaya J.M. // *Cell. Mol. Immunol.* 2018. V. 15. № 6. P. 547.
44. Huang C., Zhang Y., Deng S., Ren Y., Lu W. // *Front. Neurol.* 2020. V. 11.
45. Никитин С.С., Супонеева Н.А., Пирадов М.А., Павлов Э.В., Куренков А.Л. // Клиническая неврология. 2009. № 2. P. 30–35.
46. Koga M., Yuki N., Tsukada Y., Hirata K., Matsumoto Y. // *J. Neuroimmunol.* 2003. V. 141. № 1–2. P. 112–117.
47. Hagen K.M., Ousman S.S. // *Front. Aging Neurosci.* 2021. V. 12.
48. Sindern E., Oreja-Guevara C., Raulf-Heimsoth M., Baur X., Malin J.P. // *J. Neurol. Sci.* 1997. V. 151. № 1. P. 29–34.
49. Schneider-Hohendorf T., Schwab N., Üçeyler N., Göbel K., Sommer C., Wiendl H. // *Neurology.* 2012. V. 78. № 6. P. 402–408.
50. Mausberg A.K., Dorok M., Stettner M., Müller M., Hartung H.P., Dehmel T., Warnke C., Zu Hörste G.M., Kieseier B.C. // *Neurology.* 2013. V. 80. № 3. P. 296–303.
51. Klehmet J., Staudt M., Ulm L., Unterwalder N., Meisel A., Meisel C. // *J. Neuroimmunol.* 2015. V. 283. P. 17–22.
52. Sanvito L., Makowska A., Gregson N., Nemni R., Hughes R.A.C. // *Autoimmunity.* 2009. V. 42. № 8. P. 667–677. <https://doi.org/10.3109/08916930903140907>
53. Staudt M., Diederich J.M., Meisel C., Meisel A., Klehmet J. // *BMC Neurol.* 2017. V. 17. № 1.
54. Diederich J.M., Staudt M., Meisel C., Hahn K., Meinel E., Meisel A., Klehmet J. // *Front. Neurol.* 2018. V. 9. № MAR.
55. Chi L.J., Wang H.B., Wang W.Z. // *J. Peripher. Nerv. Syst.* 2008. V. 13. № 1. P. 54–63.
56. Van den Bergh P.Y.K., van Doorn P.A., Hadden R.D.M., Avau B., Vankrunkelsven P., Allen J.A., Attarian S., Blomkwist-Markens P.H., Cornblath D.R., Eftimov F., Goedee H.S., Harbo T., Kuwabara S., Lewis R.A., Lunn M.P., Nobile-Orazio E., Querol L., Rajabally Y.A., Sommer C., Topaloglu H.A. // *Eur. J. Neurol.* 2021. V. 28. № 11. P. 3556–3583.
57. Winer J., Hughes S., Cooper J., Ben-Smith A., Savage C. // *J. Neurol.* 2002. V. 249. № 5. P. 616–621.
58. Schmidt B., Toyka K.V., Kiefer R., Full J., Hartung H.-P., Pollard J. // *Muscle Nerve.* 1996. V. 19. № 4. P. 474–487.
59. Bosboom W.M.J., Van Den Berg L.H., De Boer L., Van Son M.J., Veldman H., Franssen H., Logtenberg T., Wokke J.H.J. // *Neurology.* 1999. V. 53. № 4. P. 837–845.
60. Селицкий М.М. // Международный неврологический журнал. 2017. V. 4. № 90. P. 77–83.
61. Karin N. // *Front. Immunol.* 2020. V. 11. P. 976.
62. Zlotnik A., Yoshie O. // *Immunity.* 2012. V. 36. № 5. P. 705–716.
63. Csurhes P.A., Sullivan A.A., Green K., Pender M.P., McCombe P.A. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2005. V. 76. № 10. P. 1431–1439.
64. Radjavi A., Smirnov I., Kipnis J. // *Brain. Behav. Immun.* 2014. V. 35. P. 58–63.
65. Bombeiro A.L., Lima B.H. de M., Bonfanti A.P., de Oliveira A.L.R. // *Mol. Immunol.* 2020. V. 121. P. 81–91.
66. Hoechst B., Gamrekelashvili J., Manns M.P., Greten T.F., Korangy F. // *Blood.* 2011. V. 117. № 24. P. 6532–6541.
67. Nguyen K.D., Vanichsarn C., Nadeau K.C. // *Eur. J. Immunol.* 2008. V. 38. № 7. P. 2034–2045.

68. *Ihara F., Sakurai D., Takami M., Kamata T., Kunii N., Yamasaki K., Iinuma T., Nakayama T., Motohashi S., Okamoto Y.* // *Cancer Immunol. Immunother.* 2019. V. 68. № 12. P. 1935–1947.
69. *Бакулин И.С., Закройщикова И.В., Супонева Н.А., Захарова М.Н.* // *Нервно-мышечные болезни.* 2017. V. 7. № 3. P. 10–20.
70. *Закройщикова И.В., Бакулин И.С., Супонева Н.А., Захарова М.Н.* // *Неврологический журн.* 2018. № 1. P. 27–33.
71. *Grassano M., Calvo A., Moglia C., Sbaiz L., Brunetti M., Barberis M., Casale F., Manera U., Vasta R., Canosa A., D'Alfonso S., Corrado L., Mazzini L., Dalgard C., Karra R., Chia R., Traynor B., Chiò A.* // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2022. V. 93. № 11. P. 1190–1193.
72. *McCombe P.A., Lee J.D., Woodruff T.M., Henderson R.D.* // *Front. Neurol.* 2020. V. 11. P. 279.
73. *Beers D.R., Zhao W., Neal D.W., Thonhoff J.R., Thome A.D., Faridar A., Wen S., Wang J., Appel S.H.* // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1.
74. *Beers D.R., Thonhoff J.R., Faridar A., Thome A.D., Zhao W., Wen S., Appel S.H.* // *Ann. Neurol.* 2022. V. 92. № 2. P. 195–200.
75. *Rolfes L., Schulte-Mecklenbeck A., Schreiber S., Vielhaber S., Herty M., Marten A., Pfeuffer S., Ruck T., Wiendl H., Gross C.C., Meuth S.G., Boentert M., Pawlitzki M.* // *Brain Commun.* 2021. V. 3. № 3.
76. *Giovannelli I., Heath P., Shaw P.J., Kirby J.* // *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* 2020. V. 21. № 5–6. P. 435–444.
77. *Sheean R.K., McKay F.C., Cretney E., Bye C.R., Perera N.D., Tomas D., Weston R.A., Scheller K.J., Djouma E., Menon P., Schibeci S.D., Marmash N., Yerbury J.J., Nutt S.L., Booth D.R., Stewart G.J., Kiernan M.C., Vucic S., Turner B.J.* // *JAMA Neurol.* 2018. V. 75. № 6. P. 681–689.
78. *Liu E., Karpf L., Bohl D.* // *Front. Mol. Neurosci.* 2021. V. 14.
79. *Beers D.R., Henkel J.S., Zhao W., Wang J., Huang A., Wen S., Liao B., Appel S.H.* // *Brain.* 2011. V. 134. № 5. P. 1293.
80. *Gustafson M.P., Staff N.P., Bornschlegl S., Butler G.W., Maas M.L., Kazamel M., Zubair A., Gastineau D.A., Windebank A.J., Dietz A.B.* // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 7.
81. *Thome A.D., Thonhoff J.R., Zhao W., Faridar A., Wang J., Beers D.R., Appel S.H.* // *Front. Immunol.* 2022. V. 13.
82. *Thonhoff J.R., Beers D.R., Zhao W., Pleitez M., Simpson E.P., Berry J.D., Cudkowicz M.E., Appel S.H.* // *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation.* 2018. V. 5. № 4.
83. *Thonhoff J.R., Berry J.D., Macklin E.A., Beers D.R., Mendoza P.A., Zhao W., Thome A.D., Triolo F., Moon J.J., Paganoni S., Cudkowicz M., Appel S.H.* // *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation.* 2022. V. 9. № 6.
84. *Yazdani S., Seitz C., Cui C., Lovik A., Pan L., Piehl F., Pawitan Y., Kläppe U., Press R., Samuelsson K., Yin L., Vu T.N., Joly A.L., Westerberg L.S., Evertsson B., Ingre C., Andersson J., Fang F.* // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1.
85. *Rentzos M., Evangelopoulos E., Sereti E., Zouvelou V., Marmara S., Alexakis T., Evdokimidis I.* // *Acta Neurol. Scand.* 2012. V. 125. № 4. P. 260–264.
86. *Garofalo S., Cocozza G., Porzia A., Inghilleri M., Raspa M., Scavizzi F., Aronica E., Bernardini G., Peng L., Ransohoff R.M., Santoni A., Limatola C.* // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1.
87. *Berzins S.P., McNab F.W., Jones C.M., Smyth M.J., Godfrey D.I.* // *J. Immunol.* 2006. V. 176. № 7. P. 4059–4065.

T-Cell Aspects of Some Neurological Diseases

A. A. Kvichansky^a and A. P. Bolshakov^a

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

Polyneuropathies are a heterogeneous group of immune-mediated diseases, among which Guillain–Barré syndrome and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy are the most frequent. On the contrary, amyotrophic lateral sclerosis is most often considered as a disease, whose development is practically not associated with changes in the function of the immune system. This review summarizes the latest data on changes in the T-lymphocyte subpopulations and their function in the blood and cerebrospinal fluid in the aforementioned diseases. These data suggest that regulatory T cells and NKT cells may play an important role in the development of the discussed pathologies. We stress the necessity of accumulation and analysis of data on T-cell subpopulations, as well as the sequence of T-cell receptors, HLA, and CD1 in patients for the development of approaches to the diagnosis and possible therapy of these diseases.

Keywords: *T-lymphocyte, amyotrophic lateral sclerosis, chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, Guillain–Barré syndrome*

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 576.32/.36

**ИНДУКЦИЯ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОГО ФЕНОТИПА В КЛЕТКАХ
НЕЙРОБЛАСТОМЫ МЫШИ ФАКТОРОМ РОСТА НЕРВОВ**

© 2023 г. А. А. Корягина¹, О. А. Недогреева¹, А. А. Буянова¹, Ю. С. Спивак¹,
А. П. Большаков¹, Н. В. Гуляева¹, М. Ю. Степаничев¹ *

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 10.05.2023 г.

После доработки 11.05.2023 г.

Принята к публикации 12.05.2023 г.

Фактор роста нервов (ФРН) является фактором, определяющим дифференцировку нейронов. ФРН играет важную роль в росте и дифференцировке сенсорных и симпатических нейронов в периферической нервной системе. В зрелом мозге ФРН участвует в поддержании холинергического фенотипа нервных клеток. В работе была исследована возможность индукции холинергического фенотипа в клетках нейробластомы мыши, которые часто используются для моделирования разных физиологических и патологических процессов, протекающих в нервной системе. Клетки нейробластомы линий NB41A3 и Neuro2a чаще всего используются, когда необходимо исследовать свойства холинергических нейронов. В клетках этих линий была обнаружена экспрессия рецепторов TrkA и p75NGFR, которая характерна для холинергических нейронов базальных ядер переднего мозга. Дифференцировку клеток вызывали аппликацией ФРН или 8-Вг-цАМФ. ФРН не вызывал выраженной дифференцировки клеток по нейрональному фенотипу. Кроме того, не было обнаружено изменений содержания мРНК и белка холинацетилтрансферазы и везикулярного транспортера ацетилхолина, которые использовали в качестве маркеров холинергического фенотипа. Таким образом, клетки линий NB41A3 и Neuro2a не могут быть рекомендованы для использования в качестве модели холинергических нейронов *in vitro*, поскольку они не дифференцируются и/или не демонстрируют признаков холинергического фенотипа в ответ на стимуляцию ФРН.

Ключевые слова: фактор роста нервов, нейробластома, дифференцировка, холинацетилтрансфераза, везикулярный транспортер ацетилхолина, ацетилхолинэстераза

DOI: 10.31857/S1027813323040131, EDN: OOFTHU

ВВЕДЕНИЕ

Дифференцировка нейронов связана со множеством морфологических и биохимических изменений. Ключевым фактором роста и дифференцировки нейронов является фактор роста нервов (ФРН). В периферической нервной системе ФРН регулирует дифференцировку сенсорных и симпатических нейронов, запуская морфологические модификации и экспрессию специфических генов [1, 2]. Широко известно, что ФРН отвечает за поддержание жизнедеятельности некоторых популяций нейронов, активируя сигнальные каскады взаимодействием с TrkA и p75 рецепторами [3]. В головном мозге ФРН необходим для поддержания фенотипических характеристик холинергических нейронов. На своих терминалях холинергические нейроны экспрессируют оба рецептора ФРН – и p75/NGFR, и TrkA/NTRK1. После связывания с этими рецепторами ФРН транспор-

тируется из проекционных областей холинергических нейронов вдоль их аксонов к телам, расположенным в подкорковых ядрах, таких как медиальное септальное ядро, ядра диагональной полоски Брока, базальное ядро Мейнерта, безымянная субстанция и другим [4]. Возрастные изменения в системе ФРН могут приводить к дегенерации холинергических нейронов в упомянутых областях [4, 5]. Введение ФРН или его сверхэкспрессия в мозге экспериментальных животных обладает нейропротекторными свойствами в моделях нейродегенеративных заболеваний [6–8]. Кроме того, введение ФРН в мозг представляется перспективным терапевтическим подходом для улучшения памяти при некоторых нейродегенеративных заболеваниях, например, при болезни Альцгеймера [9–11].

Первичные культуры клеток, полученные от животных разных видов, являются важным инструментом исследований, предназначенных для получения данных, которые не удастся получить *in vivo* [12]. Культуры холинергических нейронов

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

наиболее часто получают из медиального септального ядра или базального ядра Мейнерта. Во всех случаях эти культуры являются смешанными, содержат помимо нейронов глиальные клетки, а холинергические нейроны составляют только малую часть от общего числа клеток. Например, культуры, полученные из медиальной перегородки, помимо холинергических содержат ГАМКергические и глутаматергические нейроны [13–17]. Для того, чтобы повысить долю холинергических нейронов, используют длительную культивацию клеток в присутствии ФРН. Так, 10–12-дневное выращивание клеток в присутствии 100 нг/мл ФРН в бессывороточной среде позволяет повысить долю холинергических неронов до 36% за счет ре-дифференцировки ГАМКергических и глутаматергических нейронов септум [18]. Похожий эффект наблюдается после обработки культуры эмбриональных стволовых клеток ФРН [19].

В последние годы значительный прогресс был достигнут в области исследования индуцибельных плюрипотентных стволовых клеток человека (ИПСКЧ). Использование культур ИПСКЧ существенно улучшило понимание патогенеза и механизмов, задействованных в разных заболеваниях, и позволило продвинуться на пути к персонализированной медицине. Современные подходы дают возможность дифференцировать ИПСКЧ в разные типы нейронов, включая холинергические, моноаминергические и другие. Например, принципиальная возможность коррекции ассоциированной с болезнью Альцгеймера мутации в гене, кодирующем PSEN2, с применением CRISPR/Cas9 технологии геномного редактирования была показана на холинергических клетках, полученных из ИПСКЧ [20, 21]. Однако эти методы достаточно сложны и трудозатратны.

Другим источником клеток, которые часто используются в исследованиях *in vitro*, являются клетки, полученные из опухолей. Такие клеточные линии широко применяются как модели для изучения разнообразных процессов, протекающих при канцерогенезе [22]. В то же время, благодаря своей способности дифференцироваться в различные типы клеток, раковые клетки применяются для изучения молекулярных механизмов функционирования разных тканей. Нейробластома (neuroblastoma, NB) является солидной экстракраниальной опухолью, образующейся из клеток нервного гребня, по всей вероятности предшественников симпатoadренальных клеток, дифференцирующихся в нейроны симпатических ганглиев и хромаффинные клетки мозгового вещества надпочечников, секретирующие катехоламины [23]. После применения дифференцирующих агентов, таких как ретиноевая кислота, циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) или нейротрофины, клетки NB могут формировать отростки разной длины. Было показано, что после дифференцировки клетки линий NB41A3, Neuro2a и гибридной линии SN56 B5 G4 проявляют некоторые

черты холинергического фенотипа [24–26]. К сожалению, клетки линии SN56, полученные путем слияния иммортализованных клеток медиальной перегородки и NB, почти недоступны на рынке. В клетках линии NB41A3 можно измерить активность холинэстеразы (ХАТ) и обнаружить мРНК и белок ХАТ после длительного пересевания или аппликации цАМФ или нейротрофического фактора мозга [24, 27, 28]. В клетках линии Neuro2a можно наблюдать эти признаки холинергического фенотипа даже без применения дифференцирующих агентов [26]. Однако, ни клетки NB41A3, ни клетки Neuro2a не способны формировать холинергические синапсы в культуре [27]. Важно отметить, что наряду с холинергическими маркерами, клетки NB продолжают экспрессировать маркеры дофаминергических нейронов [29, 30].

Принимая во внимание тот факт, что важную роль в поддержании холинергического фенотипа в мозге взрослых животных играет ФРН, мы предположили, что применение ФРН может вызвать дифференцировку клеток NB в холинергические нейроны и позволит получить стабильную культуру холинергических клеток. В этой работе мы использовали ФРН для дифференцировки клеток линий NB41A3 и Neuro2a и исследовали экспрессию мРНК ХАТ и везикулярного транспортера ацетилхолина (ВАХ) и активность ХАТ для функциональной оценки, соответственно, генов холинергического локуса и фермента. Кроме того, мы оценили экспрессию ХАТ, ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и рецепторов r75 и TrkA с использованием иммуноцитохимии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Клетки нейробластомы мыши NB41A3 и Neuro2a были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, С.-Петербург, Россия). Клетки линии NB41A3 культивировали в среде F10 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% сыворотку телянка (FBS, Sigma-Aldrich, США) и смесь антибиотиков Pen Strep mixture (Gibco, США). Клетки линии Neuro2a культивировали в модифицированной среде Игла (MEM, ПанЭко, Россия), содержащей 10% FBS. Клетки выращивали в инкубаторе при 37°C и 5% CO₂. Для экспериментов клетки обрабатывали 0.05% трипсином-ЭДТА (ПанЭко, Россия) в течение 5–10 мин при 37°C. Трипсин инактивировали добавлением 10% FBS в соответствующей среде, и клетки осаждали центрифугированием. Далее, клетки ресуспендировали в культуральной среде и высевали в чашки Петри с плотностью 13×10^3 клеток/см².

Для экспериментов с дифференцировкой клеток, посеянные с плотностью 13×10^3 клеток/см² в среду, содержащую 10% FBS в чашки Петри диаметром 10 см или 6- или 24-луночные планшеты, инкубировали при 37°C и 5% CO₂. Через 4 ч

среду замешали на новую порцию с 0.5% FBS и одним из дифференцирующих агентов ФРН или 8-Br-цАМФ (оба Sigma-Aldrich, США) или без них. Использовали ФРН человека в конечной концентрации 20 нг/мл или 8-Br-цАМФ в конечной концентрации 1 мкмоль. Реагенты растворяли в стерильной воде и добавляли 10 мкл водного раствора в культуру. Клетки инкубировали в течение 48 ч.

Морфологическая оценка дифференцировки. По окончании дифференцировки культуры исследовали с помощью фазово-контрастной микроскопии с использованием автоматизированного микроскопа Keyence BZ-9000 (Keyence Corporation of America, США). Фотографирование проводили с увеличением объектива $\times 20$, используя CCD камеру Keyence и программное обеспечение BZ-II Viewer (Keyence Corporation of America, США), и сохраняли изображения в виде .tiff файлов. Оценку длины отростков проводили с помощью программного пакета ImageJ/Fiji (Version 1.52p, NIH, USA). Для этого изображения переводили в 8-битный формат оттенков серого и анализировали с помощью плагина "NeuronJ", как описано в работе [31]. Подсчитывали число отростков и измеряли их длину. Подсчеты проводили в 5 оптических полях 3-х культур для каждого условия эксперимента. Использовали образцы из трех независимых серий экспериментов.

Иммуноцитохимия. Для проведения иммуноцитохимической детекции экспрессии белков клетки выращивали на 10-мм покровных стеклах, покрытых поли-L-лизинном (Sigma-Aldrich, США), помещенных в лунки 24-луночных планшетов. Клетки фиксировали 4% параформальдегидом (PanReas AppliChem, ФРГ) в течение 15 мин при комнатной температуре. Клетки промывали фосфатно-солевым буфером pH 7.4 (ФСБ) и хранили в 0.02% растворе NaN_3 в ФСБ при 4°C до использования. Перед окрашиванием клетки трижды промывали ФСБ и неспецифическое связывание блокировали ФСБ, содержащим 5% нормальную сыворотку козы или осла (Sigma-Aldrich, США), 0.3% тритона X-100 (Serva, ФРГ) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали с одним из первичных антител, разбавленных блокирующим буфером, при 4°C в течение ночи. Список использованных антител представлен в табл. 1. На следующий день клетки промывали трижды ФСБ и инкубировали с одним из соответствующих вторичных антител (табл. 1), конъюгированных с одним из флюорофоров Alexa 488 или Alexa 546 в течение 2 ч при комнатной температуре. После промывания клетки заключали в среду Fluoroshield с DAPI (Sigma-Aldrich, USA) и хранили при -18°C . Препараты изучали, используя микроскоп Axioskop 2 (Carl Zeiss, ФРГ).

Полимеразная цепная реакция. После окончания дифференцировки клетки дважды промывали холодным ФСБ, снимали с чашек, осаждали, замораживали и хранили при -80°C . Общую РНК

экстрагировали с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Изолированную тотальную РНК (1 мкг) очищали от следов геномной ДНК с использованием 1 U ДНКазы I (ThermoScientific, США). Синтез кДНК проводили с 0.5 мкг РНК с помощью набора реактивов MMLV RT kit (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Образцы ДНК разбавляли деионизированной водой в соотношении 1 : 9 и хранили при -20°C .

В качестве позитивного контроля использовали РНК, полученную из спинного мозга и гиппокампа самцов мышей C57Bl/6. Образцы ткани забирали после эвтаназии животных, замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Общую РНК экстрагировали из образцов ткани массой ~ 70 мг после их гомогенизации в реагенте ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя.

Экспрессию генов *Chat*, *Vacht* и *Ache* оценивали с помощью ПЦР с обратной транскрипцией. Для амплификации использовали 2 мкл комплементарной ДНК проводили в присутствии 5 U Taq ДНК полимеразы (Евроген, Россия), 200 мкмоль каждого dNTP и 20 пмоль каждого из двух праймеров (табл. 2). Протокол амплификации включал следующие стадии: 3 мин 95°C , 32 цикла амплификации (инкубация при 95°C , $50-66^\circ\text{C}$ и 72°C в течение 15, 15 и 30 с соответственно), 5 мин при 72°C . Температуры отжига для каждой пары праймеров указаны в табл. 2.

Образцы охлаждали и 20 мкл продукта ПЦР разделяли электрофоретически в 1% агарозном геле, содержащем 0.5 мг/мл бромида этидия параллельно со стандартными фрагментами ДНК известного размера. Гели фотографировали в УФ свете.

Содержание транскриптов мРНК генов *Ntrk1* and *Ngfr* определяли с помощью ПЦР в реальном времени, используя амплификатор Bio-Rad CFX-384 (Bio-Rad, США). Реакцию проводили с использованием набора qPCRmix-HS SYBR + Low-ROX PCR mix (Евроген, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Относительное содержание мРНК нормализовали по геометрическому среднему экспрессии мРНК гена *Gapdh*. В качестве негативного контроля использовали образцы, предварительно обработанные ДНКазой I. Экспрессию генов рассчитывали по методу $E^{-\Delta\Delta Ct}$.

Амплификацию фрагмента гена *Chat* в образцах, полученных из клеток NB41A3 и Neuro2a, проводили с помощью ПЦР с вложенными праймерами, как описано в работе [28]. Контрольные образцы РНК получали из спинного мозга мыши. Сначала выполняли ПЦР с использованием пары внешних праймеров (табл. 2), затем 5 мкл реакционной смеси брали в качестве матрицы для амплификации с использованием пары внутренних праймеров. Продукты ПЦР разделяли с помощью

Таблица 1. Список антител, использованных в работе

Антиген	Тип	Кат. ##, производитель	Разведение	Условия
ChAT	Rabbit polyclonal IgG	sc-20672; Santa Cruz Biotechnology	1 : 200	12–16 h +4°C
ChAT	Mouse monoclonal IgG	sc-55557; Santa Cruz Biotechnology	1 : 200	12–16 h +4°C
ChAT	Rabbit monoclonal IgG	ab-178850; Abcam	1 : 200	12–16 h +4°C
ChAT	Mouse monoclonal IgG	AMAb-91129; Sigma-Aldrich	1 : 200	12–16 h +4°C
AChE	Goat polyclonal IgG	sc-6432; Santa Cruz Biotechnology	1 : 200	12–16 h +4°C
VACHT	Rabbit polyclonal IgG	NB100-91348; Novus	1 : 200	12–16 h +4°C
P75NTR	Rabbit monoclonal IgG	mAb-8238; Cell Signaling Technology	1 : 200	12–16 h +4°C
P75NGFR	Rabbit polyclonal IgG	ANT-007, Alomone Lab	1 : 200	12–16 h +4°C
TrkA	Rabbit polyclonal IgG	ANT-018, Alomone Lab	1 : 200	12–16 h +4°C
TrkA	Rabbit monoclonal IgG	mAb-2510, Cell Signaling Technology	1 : 200	12–16 h +4°C
Rabbit IgG fragment (H + L)	Goat polyclonal IgG-AlexaFluor 546 conjugate	A-11010; Invitrogen	1 : 500	3 h +20–22°C
Rabbit IgG fragment (H + L)	Goat polyclonal IgG-AlexaFluor 488 conjugate	A-11008; Invitrogen	1 : 500	3 h +20–22°C
Goat IgG (H + L)	Donkey polyclonal IgG-AlexaFluor 488 conjugate	A-11055; Invitrogen	1 : 500	3 h +20–22°C
Mouse IgG (H + L)	Goat polyclonal IgG-AlexaFluor 488 conjugate	A-11017; Invitrogen	1 : 500	3 h +20–22°C

электрофореза в 1% агарозном геле, содержащем 0.5 мг/мл бромида этидия и стандартных образцов ДНК с известной массой. Гели фотографировали в УФ свете.

Для рестрикционного анализа продукты ПЦР вырезали из агарозного геля и очищали с применением набора реагентов Cleanup Mini kit (Евроген, Россия). Рестрикционный анализ выполняли с помощью эндонуклеазы AfeI (NEB, США). Получившиеся продукты реакции разделяли электрофорезом в 1% агарозном геле.

Для секвенирования продукты ПЦР вырезали из агарозного геля, как указано выше. Очищенные продукты субклонировали в вектор pAL2-T с использованием набора реагентов TA Cloning (Евроген, Россия) и протокола производителя. Рекombинантный вектор трансформировали в TOP10' E. coli по стандартному протоколу теплового шока. Плазмиды, содержавшие ПЦР инсерции очищали с использованием набора реагентов Plasmid Miniprep kit (Евроген, Россия). Для определения последовательностей ПЦР инсерций проводили секвенирование по Сэнгеру (Евроген, Россия). Анализ последовательностей проводили с помощью программных средств Lasergene SeqMan (DNASTAR, США) и BLAST (NCBI, США).

Определение активности ХАТ. Измерение активности ХАТ проводили с использованием набора реагентов Choline Acetyltransferase (ChAT) Activity Assay Kit (Cloud Clone Corp., КНР). Клетки собирали, гомогенизировали и центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин. Супернатанты использовали для анализа. Реакцию проводили согласно инструкции производителя. Оптическую плотность растворов, содержавших продукты реакции, измеряли спектрофотометрически при длине волны 324 нм с помощью планшетного спектрофотометра HidexSense (Hidex, Финляндия). Активность ХАТ рассчитывали с использованием коэффициента молярной экстинкции и представляли в виде нмоль/ч/мг белка. В качестве позитивного контроля использовали гомогенаты гиппокампа и неокортекса мыши. Содержание белка определяли по методу Брэдфорда.

Статистический анализ. Соответствие распределения полученных данных нормальному оценивали с помощью W-теста Шапиро–Уилка. Сравнение данных проводили с использованием непараметрического теста Краскела–Уоллиса с последующим множественным сравнением по тесту Данна. Результаты представлены в виде медианы и значений верхней и нижней квартилей.

Таблица 2. Последовательности праймеров, использованных в работе

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Отжиг T , °C
Chat	CTTGAATGGAGCGAATCGTTGGTA	GAGCTTCTTGTTCCTGTCATCA	66
Chat	Внешние праймеры		65 с постепенным снижением температуры на 0.5°C за каждый цикл до 50°C
	GGCAGCCTCTGTATGAAGC	CAGCCTTGTGGTCAGTCATGG	
	Внутренние праймеры		
	ATGAACGCCTGCCTCCAATCG	GGATGAAGCCATCAGGACTGC	
Vacht	CGCGATGTGCTGCTTGATGAAC	GGGTCTGCAGCTGCGGGAGT	62
Acche	CGGCCTCCTTGGATGTGTATG A	AAGCCGTTGATCCAGCAGACCTA	66
Ntrk1	CCAGATGCCAATGACTCTG	CCCAGCACGTCACATTCTTC	60
Ngfr	CGAGACCTCATAGCCAGCACAG	CACAACCACAGCAGCCAAGATG	65
Gapdh	TTCAACAGCAACTCCCACTCTT	CCCGTATTCAATTGTCATACCAG	63

Различия между группами считали значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клетки линий NB41A3 и Neuro2a экспрессируют рецепторы p75 и TrkA. Была выполнена иммунохимическая детекция присутствия рецепторов ФРН в клетках линий NB41A3 и Neuro2a. Клетки фиксировали через 48 ч после обработки ФРН и 8-Br-цАМФ. Клетки экспрессировали оба рецептора ФРН даже в отсутствие дифференцирующих агентов (рис. 1a). В обедненной среде клетки формировали отростки и та же картина сохранялась в присутствии и ФРН, и 8-Br-цАМФ. Специфичные антитела к рецепторам связывались с рецепторами как на теле клеток, так и на отростках. Окраска наблюдалась практически во всех клетках исследованных образцов культуры.

Экспрессия мРНК генов, кодирующих p75 и TrkA, наблюдалась во всех образцах клеток NB41A3 независимо от условий эксперимента (рис. 1б).

Влияние ФРН на дифференцировку клеток линий NB41A3 и Neuro2a. Применение различных дифференцирующих агентов, включая цАМФ, ретиноевую кислоту, 5-аза-2'-дезоксцитидин, нейротрофический мозговой фактор и другие, вызывает дифференцировку клеток нейробластомы в нейроно-подобные клетки. После прикрепления клеток к дну чашек клетки NB изменяют свою морфологию, формируя отростки в направлении соседних клеток. Сразу после прикрепления эти отростки короткие и становятся длиннее по мере старения культуры. Мы оценили показатели морфологической дифференцировки, такие как число отростков и их длина (рис. 2).

Доля клеток NB41A3, которые образовывали отростки, была значимо меньше после аппликации 8-Br-цАМФ (Kruskal-Wallis test $H(3, 52) = 20.47, p < 0.0001$), хотя их длина была сходна после применения обоих дифференцирующих аген-

тов ($H(3, 52) = 3.62, p > 0.16$). В культуре клеток Neuro2a доля клеток, формирующих отростки, не менялась существенно после 48 ч. инкубации в присутствии ФРН или 8-Br-цАМФ ($H(3, 65) = 5.34, p > 0.06$). В то же время длина отростков значимо возрастала в дифференцирующихся клетках Neuro2a ($H(3, 65) = 24.01, p < 0.0001$). Этот эффект был более выражен в случае инкубации с 8-Br-цАМФ ($p < 0.001$ согласно тесту Данна). Таким образом, дифференцирующий эффект ФРН не проявлялся ни в культуре NB41A3, ни в культуре Neuro2a, тогда как 8-Br-цАМФ снижал долю дифференцирующихся клеток NB41A3 и стимулировал формирование отростков в клетках Neuro2a.

Влияние ФРН на экспрессию маркеров холинэргических нейронов в клетках линий NB41A3 и Neuro2a. ХАТ – ключевой фермент, участвующий в синтезе АХ и поэтому являющийся основным маркером дифференцированных холинэргических нейронов. Мы предполагали, что аппликация ФРН в культуры клеток линий NB41A3 и Neuro2a будет способствовать экспрессии ХАТ, ВТАХ и АХЭ. Используемые антитела к ХАТ не смогли выявить присутствия этого фермента в телах недифференцированных клеток (рис. 3). Ни ФРН, ни 8-Br-цАМФ не влияли на характер окрашивания клеток (рис. 3). Также не удалось выявить окрашивания ВТАХ. Клетки обеих линий окрашивались антителами к АХЭ, указывая на вероятную экспрессию этого фермента. Таким образом, нам не удалось выявить присутствия значимых количеств ХАТ и ВТАХ в исследованных культурах клеток после действия ФРН.

Для детекции экспрессии мРНК ХАТ, ВТАХ и АХЭ был использован метод ПЦР с последующим разделением продуктов реакции в агарозном геле. Как и ожидалось, в экстрактах клеток NB41A3 обнаружили присутствие транскриптов гена *Ache*, которое наблюдалось в виде полосы, соответствующей полосе, полученной для экстрактов мозга мыши. В то же время, использование стандартного протокола ПЦР не позволило выявить транскриптов генов *Chat* или *Vacht* (рис. 4a). Кроме то-

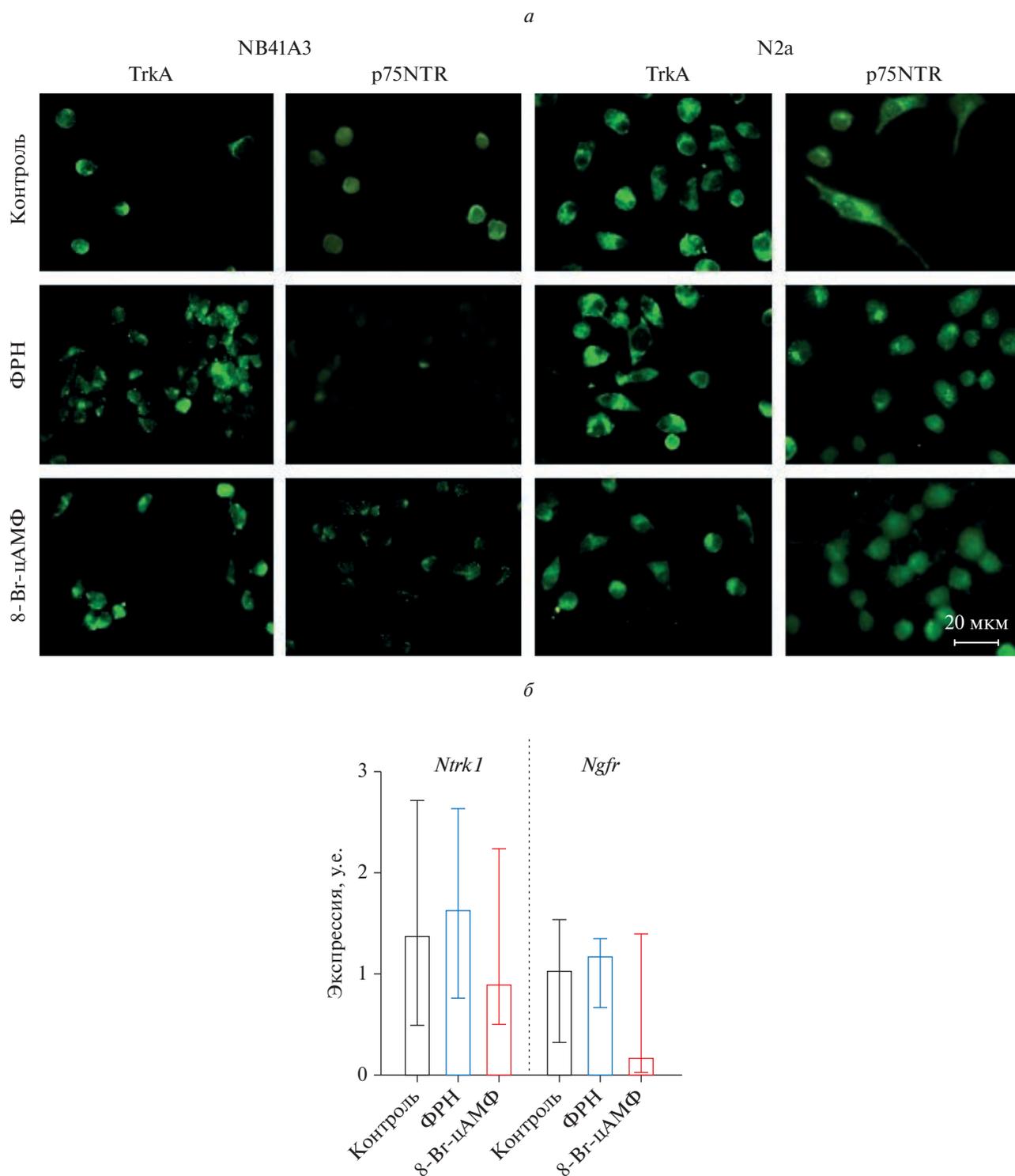


Рис. 1. Экспрессия рецепторов TrkA и p75NTR в клетках NB41A3 и Neuro2a (N2a). Клетки фиксировали через 48 ч после инкубации с растворителем (Vehicle) или одним из дифференцирующих реагентов ФРН или 8-Br-цАМФ. (а) Микрофотографии культур клеток; (б) экспрессия мРНК генов *Ntrk1* и *Ngfr*, кодирующих рецепторы TrkA и p75NTR.

го, ни ФРН, ни 8-Br-цАМФ не влияли на экспрессию мРНК этих генов в культуре клеток.

Двухстадийная ПЦР со вложенными праймерами была дополнительно использована для об-

наружения мРНК *Chat* в клетках линий NB41A3 и Neuro2a, как это описано ранее [28]. Используя этот подход, мы обнаружили полосы, которые демонстрировали сходную, хотя и меньшую массу

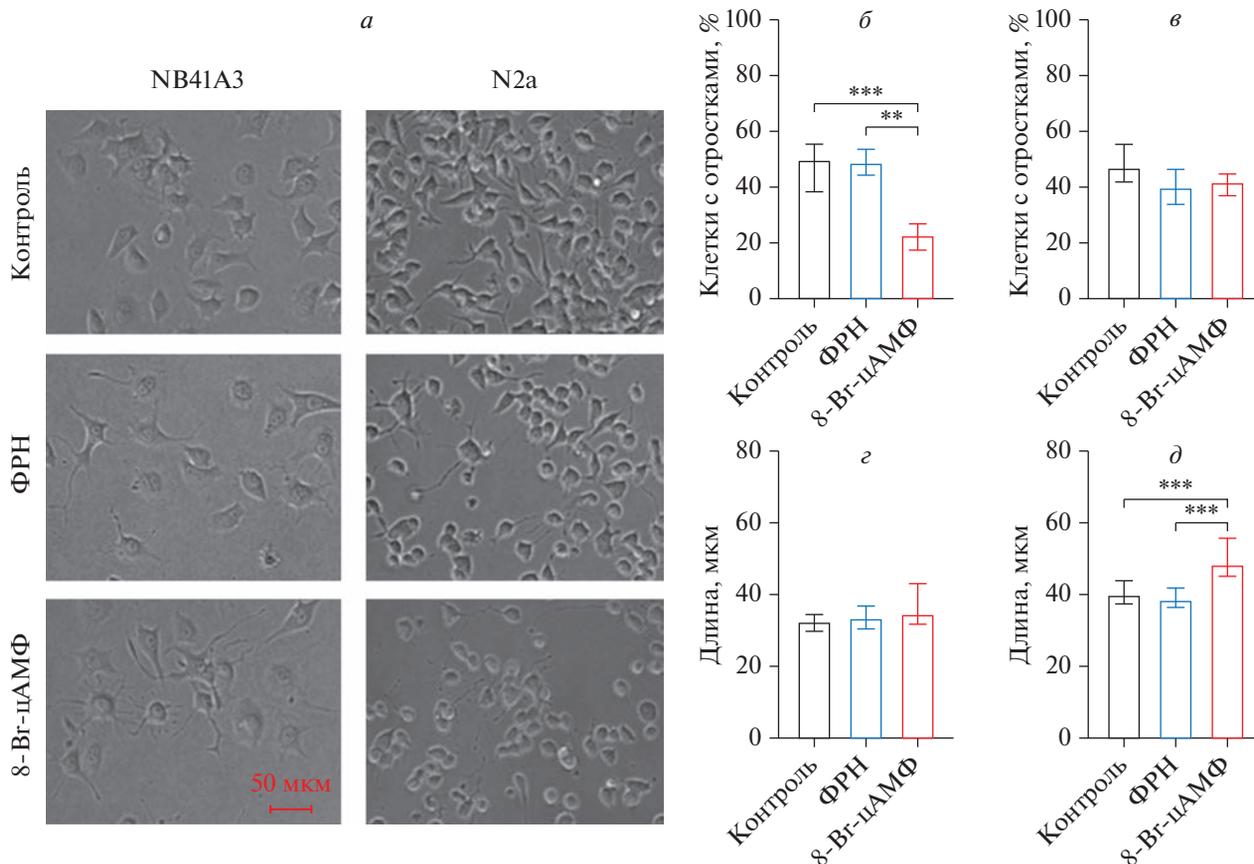


Рис. 2. Влияние ФРН и 8-Br-цАМФ на дифференцировку клеток NB41A3 и Neuro2a (N2a). (a) Микрофотографии культур клеток через 48 ч после инкубации с растворителем (Vehicle) или одним из дифференцирующих реагентов ФРН или 8-Br-цАМФ; (б и в), число клеток с отростками (в % от общего числа клеток в поле зрения); (г и д), длина отростков (мкм); (е и з), клетки линии NB41A3; (в и д), клетки линии Neuro2a (N2a). Данные представлены в виде медиан и размаха между верхним и нижним квартилями. Различия статистически значимы при ** – $p < 0.01$ и *** – $p < 0.001$, согласно критерию Данна для множественных сравнений.

по сравнению с массой транскриптов из спинного мозга или неокортекса мыши (рис. 4б). Чтобы проверить возможное соответствие транскриптов, полученных из клеток, транскриптам из мозга мыши, был проведен рестрикционный анализ с помощью эндонуклеазы AfeI. Продукты ПЦР, полученные из структур головного мозга, расщеплялись нуклеазой AfeI, в то время как продукты из клеточных культур ею не расщеплялись. Таким образом, можно предположить, что продукты ПЦР из клеточных культур не соответствовали последовательности гена *Chat*. Наконец, был проведен анализ последовательностей продуктов ПЦР со вложенными праймерами. Было обнаружено, что последовательности продуктов ПЦР из клеток NB41A3 и Neuro2a не соответствовали последовательности гена *Chat*, и никаких комплементарных последовательностей выявлено не было. Эти данные дополнительно подтвердили наш предыдущий вывод о том, что в образцах клеток NB41A3 и Neuro2a отсутствовала мРНК *Chat*, и она не появлялась после воздействия ФРН или 8-Br-цАМФ.

Далее была измерена активность ХАТ в клетках NB41A3 и Neuro2a. Специфическая активность фермента варьировала от почти недетектируемого до очень низкого уровня. Так, в культуре NB41A3 активность ХАТ составляла 0–6.3 нмоль/ч/мг белка, а в культуре Neuro2a практически не детектировалась ни в одном из исследованных образцов. В гиппокампе и неокортексе мыши активность ХАТ, измеренная тем же методом, составила 0.90 и 0.47 нмоль/ч/мг белка, соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Клетки нейробластомы проявляют широкий спектр нейрохимических, электрофизиологических и морфологических свойств в культуре. В настоящем исследовании мы попытались применить ФРН в качестве инструмента для индукции холиннергического фенотипа в двух клеточных линиях нейробластомы NB41A3 и Neuro2a из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Используя

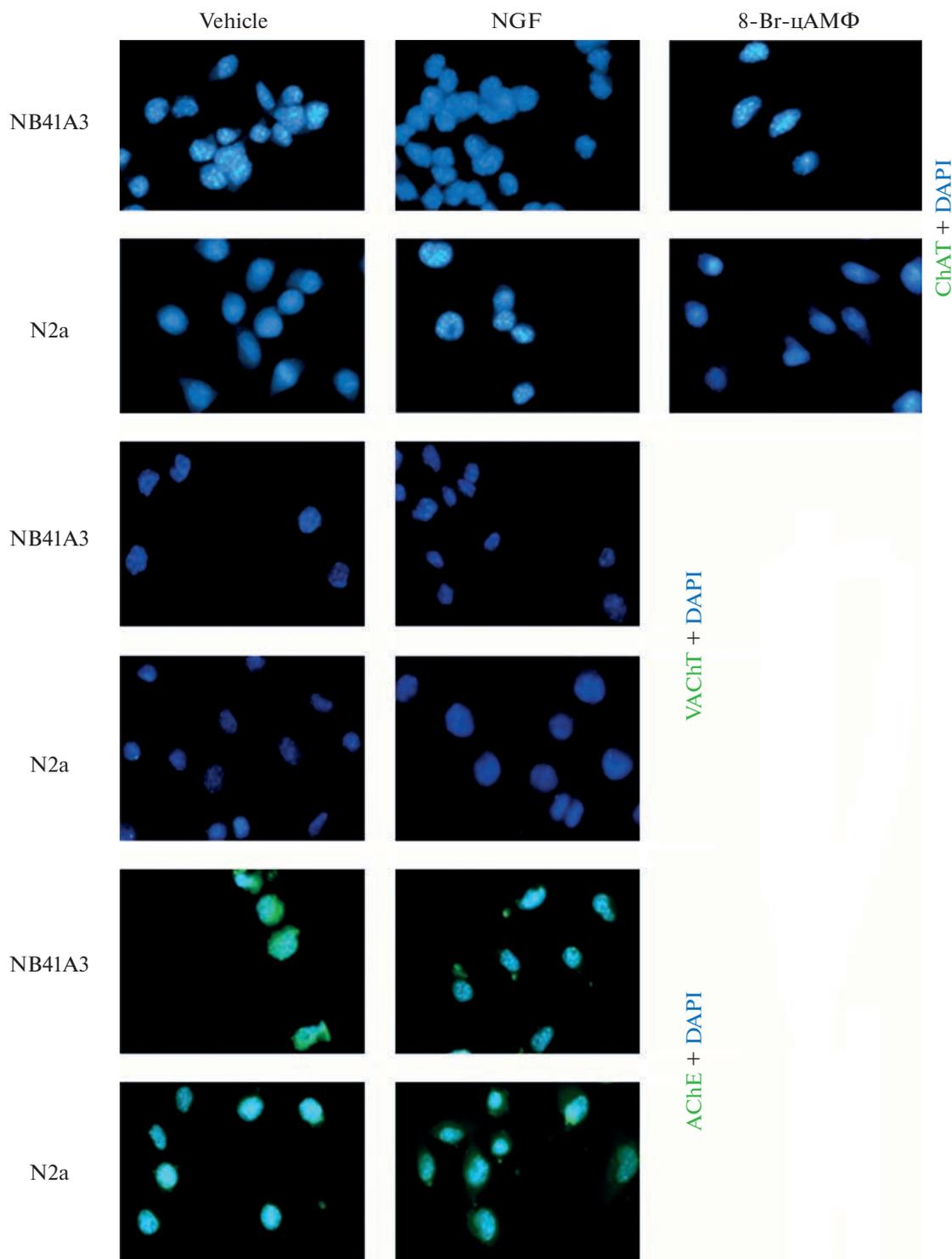


Рис. 3. Экспрессия холинергических маркеров в клетках NB41A3 и Neuro2a (N2a) в контроле и после действия дифференцирующих реагентов ФРН или 8-Br-цАМФ. Белки ХАТ, ВТАХ, АХЭ выявляли с помощью специфических антител (см. Материалы и методы) с последующей детекцией связывания вторичными антителами, конъюгированными с Alexa488 (зеленый) и окраской ядер красителем DAPI.

иммуоцитохимию, были подтверждены данные предыдущих исследований о том, что клетки обеих линий экспрессировали мембранные рецепторы для ФРН, в частности TrkA и p75. Мы ожида-

ли, что применение ФРН активирует внутриклеточные каскады, способствующие экспрессии генов, ответственных за поддержание холинергического фенотипа. Однако не было выявлено ка-

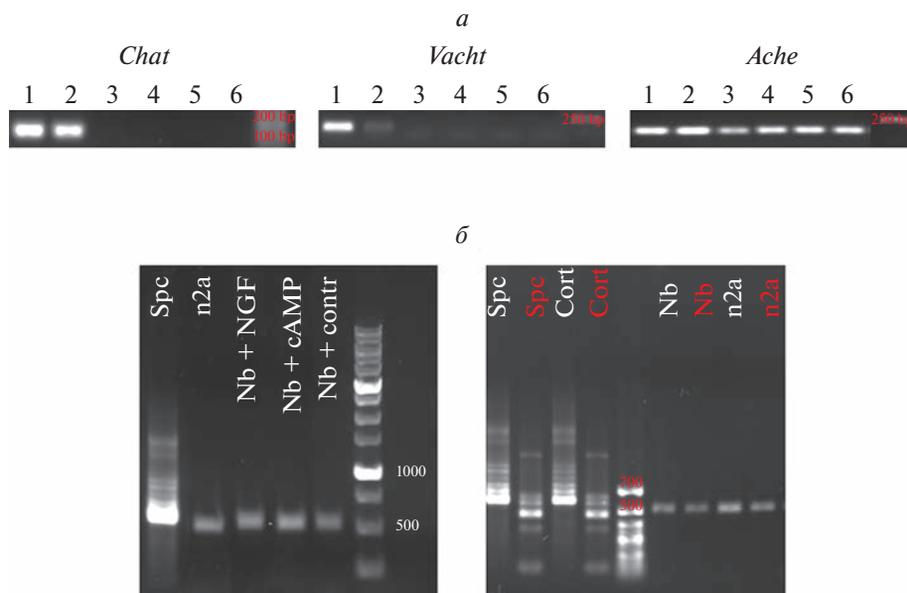


Рис. 4. Экспрессия холинергических генов в клетках NB41A3 и Neuro2a (N2a) после 48 ч инкубации с ФРН или 8-Br-цАМФ. (а) Экспрессия генов в клетках NB41A3. Дорожки: (1) гиппокамп; (2) спинной мозг; (3) NB41A3 контроль; (4) NB41A3+8-Br-цАМФ, (5) NB41A3+ФРН; (6) NB41A3+растворитель; (б) экспрессия гена *Chat* в клетках NB41A3 и N2a. Слева – анализ продуктов ПЦР с вложенными праймерами; справа – результаты рестрикционного анализа с использованием AfeI.

кой-либо значимой экспрессии белка или мРНК ХАТ в контрольных клетках или клетках, обработанных ФРН. Несмотря на то, что некоторые мРНК-подобные продукты *Chat* были обнаружены с помощью двухэтапной ПЦР со вложенными праймерами, дополнительный рестрикционный анализ этих продуктов ПЦР и их секвенирование не выявили никакого сходства между транскриптами и последовательностью гена *Chat*. Интересно, что ФРН не влиял на дифференцировку клеток NB41A3 и Neuro2a в течение 48-часовой инкубации.

Клетки нейробластомы до некоторой степени напоминают клетки-предшественники нейронов [22, 23, 32]. Добавление ряда веществ может индуцировать дифференцировку этих клеток как морфологически путем индукции роста нейритов, так и химически путем активации экспрессии нейрон-специфичных генов. В представленной работе были исследованы эффекты 8-Br-цАМФ и ФРН в клетках NB41A3 и Neuro2a. Хорошо известно, что цАМФ является естественным активатором протеинкиназы А (РКА), а активация сигнального каскада цАМФ/РКА ингибирует пролиферацию клеток и индуцирует дифференцировку клеток с удлинением отростков [33, 34]. Эти эффекты цАМФ были четко подтверждены в настоящем исследовании с использованием клеток Neuro2a, но не NB41A3. ФРН также имеет решающее значение для дифференцировки и выживания определенных популяций нейронов. Эффект ФРН опосредуется активацией рецепторов TrkA, ассоциированных с активируемыми

митогенами протеинкиназами (МАРК) и каскадами Ras (Ras/Raf/МЕК/ЕРК). Взаимодействие ФРН с рецепторами TrkA в опухолевых клетках приводит к ингибированию их пролиферации и индукции их дифференцировки с образованием отростков [35–37]. Этот механизм требует участия цАМФ-активируемой киназы и Ca²⁺-кальмодулин-зависимой протеинкиназы. В настоящем исследовании не было выявлено дифференцирующего эффекта ФРН в клетках NB41A3 или Neuro2a. Таким образом, в отличие от предыдущего исследования [28], 48-инкубация клеток NB41A3 с цАМФ или ФРН была недостаточной для индукции дифференцировки. Кроме того, в клетках Neuro2a влияние ФРН на морфологические показатели дифференцировки было менее выраженным по сравнению с цАМФ.

Экспрессия холинергического фенотипа критически зависит от присутствия как TrkA, так и p75 рецепторов. В головном мозге холинергические нейроны базальных ядер переднего мозга составляют одну из немногих популяций нейронов, в которых экспрессия p75 сохраняется на протяжении всей жизни. Более того, среди нейронов базальных ядер переднего мозга только холинергические нейроны экспрессируют рецептор p75 [38]. Sobreviela и соавт. [39] показали, что практически все нейроны стриатума совместно экспрессируют TrkA и ХАТ, но не рецептор p75. В пределах комплекса септум-диагональная поллюка практически все нейроны, содержащие ХАТ, при этом экспрессируют как TrkA, так и p75 рецепторы. В базальном ядре были обнаруже-

ны многочисленные нейроны, экспрессирующие TrkA/ХАТ и TrkA/p75. Однако некоторые другие группы нейронов могут экспрессировать рецепторы TrkA в других областях мозга. Ген *Chat* содержит цАМФ- и ФРН-чувствительные элементы, указывающие на участие обоих веществ в регуляции экспрессии ХАТ [40]. Имеется несколько работ, демонстрирующих экспрессию ХАТ в клетках нейробластомы [24–28]. В настоящем исследовании мы не смогли иммуноцитохимически обнаружить белок ХАТ, несмотря на применение нескольких антител от разных производителей, которые эффективно выявляли ХАТ в срезах головного мозга. Также не удалось измерить какую-либо значимую ферментативную активность ХАТ. Более того, хотя двухэтапный ПЦР-анализ со вложенными праймерами выявил транскрипты с массой, аналогичной таковой в образцах головного мозга, последующее секвенирование продуктов ПЦР не обнаружило какого-либо соответствия последовательности мРНК нейробластомы ожидаемой последовательности мРНК *Chat* из головного мозга. Это дополнительно подтверждает тот факт, что клетки NB41A3 и Neuro2a не экспрессировали ХАТ, основной фермент, ответственный за синтез АХ в холинергических нейронах. Важно, что в настоящем исследовании была проведена детальная идентификация продуктов ПЦР, которая отсутствовала в предыдущих исследованиях. Например, мы применили праймеры, описанные в работе [28], для ПЦР со вложенными праймерами; однако авторы этой работы не исследовали последовательности конечных продуктов реакции.

Безусловно, нельзя исключить вероятность того, что отсутствие экспрессии ХАТ в клетках NB может быть связано с недостаточным ингибированием пролиферации клеток или слабым дифференцирующим эффектом использованных веществ. Например, Rosenberg et al. [24] отмечали, что специфическая активность ХАТ наблюдалась только в условиях, когда пролиферация клеток NB41A3 была полностью подавлена. Остановка пролиферации важна также и для появления других холинергических маркеров, таких как активность АХЭ [41] или экспрессия рецепторов АХ [42]. Однако, нам удалось иммуноцитохимически выявить экспрессию белка АХЭ даже в недифференцированных клетках обеих исследованных линий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Клеточные модели часто используются в различных областях нейробиологии, включая исследования пролиферации, развития и дифференцировки клеток, токсикологические исследования, нейродегенерации и другие. Клетки нейробластомы часто используются в качестве модельной системы, которая позволяет получать нейроноподобные клетки различных фенотипов. Линии

NB41A3 и Neuro2a были использованы в серии исследований в качестве модели холинергических нейронов. Однако в настоящем исследовании было продемонстрировано, что эти клетки могут лишь частично демонстрировать признаки холинергических клеток. Кроме того, применение важного фактора дифференцировки и поддержания холинергического фенотипа *in vivo* ФРН оказалось недостаточным для индукции этого фенотипа в клетках нейробластомы. Таким образом, необходимо более широкое и тщательное исследование клеток, полученных из опухолей, перед тем как рекомендовать культуры нейробластомы для изучения специфических фенотипов нейронов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20–015–00226).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meakin S.O., Shooter E.M. // Trends Neurosci. 1992. V. 15. P. 323–331.
2. Sofroniew M.V., Howe C.L., Mobley W.C. // Annu. Rev. Neurosci. 2001. V. 24. P. 1217–1281.
3. Chao M.V. // Nat. Rev. Neurosci. 2003. V. 4. P. 299–309.
4. Niewiadomska G., Mietelska-Porowska A., Mazurkiewicz M. // Behav. Brain Res. 2011. V. 221. P. 515–526.
5. Schliebs R., Arendt T. // Behav. Brain Res. 2011. V. 221. P. 555–563.
6. Tuszyński M.H. // Cell Transplant. 2000. V. 9. P. 629–636.
7. Dobryakova Y.V., Spivak Y.S., Zaichenko M.I., Koryagina A.A., Markevich V.A., Stepanichev M.Y., Bolshakov A.P. // Front. Neurosci. 2021. V. 15. P. 745050.
8. Dobryakova Y.V., Zaichenko M.I., Spivak Y.S., Stepanichev M.Y., Markevich V.A., Bolshakov A.P. // Neurochem. J. 2021. V. 15. P. 273–281.
9. Stepanichev M.Y. // Neurochem. J. 2011. V. 5. P. 159–168.
10. Tuszyński M.H., Yang J.H., Barb D., U H.S., Bakay R.A., Pay M.M., Masliah E., Conner J.M., Kobalka P., Roy S., Nagahara A.H. // JAMA Neurol. 2015. V. 72. P. 1139–1147.
11. Tuszyński M.H., Thal L., Pay M., Salmon D.P., U H.S., Bakay R., Patel P., Blesch A., Vahlsing H.L., Ho G., Tong G., Potkin S.G., Fallon J., Hansen L., Mufson E.J., Kordower J.H., Gall C., Conner J. // Nat. Med. 2005. V. 11. P. 551–555.
12. Ferro M., Doyle A. // Cell Biol. Toxicol. 2001. V. 17. P. 205–212.
13. Colom L.V., Castaneda M.T., Reyna T., Hernandez S., Garrido-Sanabria E. // Synapse. 2005. V. 58. P. 151–164.

14. Colom L.V., Castaneda M.T., Aleman D., Touhami A. // *Neurosci. Lett.* 2013. V. 541. P. 54–57.
15. Huh C.Y.L., Danik M., Manseau F., Trudeau L.E., Williams S. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. P. 1404–1409.
16. Teles-Grilo Ruivo L.M., Mellor J.R. // *Front. Synaptic Neurosci.* 2013. V. 5. P. 2.
17. Mangoura D., Vernadakis A. // *Dev. Brain Res.* 1988. V. 40. P. 25–35.
18. Latina V., Caioli S., Zona C., Ciotti M.T., Amadoro G., Calissano P. // *Front. Cell Neurosci.* 2017. V. 11. P. 68.
19. Antonov S.A., Manuilova E.S., Dolotov O.V., Kobylansky A.G., Safina D.R., Grivennikov I.A. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. V. 162. P. 679–683.
20. Ortiz-Virumbrales M., Moreno C.L., Kruglikov I., Marazuela P., Sproul A., Jacob S., Zimmer M., Paull D., Zhang B., Schadt E.E., Ehrlich M.E., Tanzi R.E., Arancio O., Noggle S., Gandy S. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2017. V. 5. P. 77.
21. Moreno C.L., Guardia L., Della Shnyder V., Ortiz-Virumbrales M., Kruglikov I., Zhang B., Schadt E.E., Tanzi R.E., Noggle S., Buettner C., Gandy S. // *Mol. Neurodegener.* 2018. V. 13. P. 33.
22. Campos Cogo S., Gradowski Farias da Costa do Nascimento T., de Almeida Brehm Pinhatti F., de França Junio N., Santos Rodrigues B., Cavalli L.R., Elifio-Esposito S. // *Exp. Biol. Med.* 2020. V. 245. P. 1637–1647.
23. Johnsen J.I., Dyberg C., Wickström M. // *Front. Mol. Neurosci.* 2019. V. 12. P. 9.
24. Rosenberg R.N., Vandeventer L., De Francesco L., Friedkin M.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1971. V. 68. P. 1436–1440.
25. Blusztajn J.K., Venturini A., Jackson D.A., Lee H.J., Wainer B.H. // *J. Neurosci.* 1992. V. 12. P. 793–799.
26. Kumar M., Katyal A. // *Data Br.* 2018. V. 21. P. 2435–2440.
27. Thompson J., London E., Johnson Jr.J. // *Neuroscience.* 1982. V. 7. P. 1807–1815.
28. Thompson G., Lewis J., Mawdsley D. // 2012. <https://www.dst.defence.gov.au/publication/characterisation-cell-culture-system-investigating-nerve-agent-neurotoxicology-part-i>
29. Monsma F.J., Brassard D.L., Sibley D.R. // *Brain Res.* 1989. V. 492. P. 314–324.
30. Dziejzicka-Wasylewska M., Solich J. // *Mol. Brain Res.* 2004. V. 128. P. 75–82.
31. Pemberton K., Mersman B., Xu F. // *J. Undergrad. Neurosci. Educ.* 2018. V. 16. P. A186–194.
32. Zeineldin M., Patel A.G., Dyer M.A. // *Neuron.* 2022. V. 110. P. 2916–2928.
33. Chen T., Hinton D., Zidovetzki R., Hofman F. // *Lab. Invest.* 1998. V. 78. P. 165–174.
34. Sánchez S., Jiménez C., Carrera A.C., Diaz-Nido J., Avila J., Wandosell F. // *Neurochem. Int.* 2004. V. 44. P. 231–242.
35. Aloe L., Rocco M.L., Balzamino B.O., Micera A. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2016. V. 35. P. 1–7.
36. Martorana F., Gaglio D., Bianco M.R., Aprea F., Virtuoso A., Bonanomi M., Alberghina L., Papa M., Colangelo A.M. // *Cell Death Dis.* 2018. V. 9. P. 391.
37. Reichardt L.F. // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2006. V. 361. P. 1545–1564.
38. Yeo T.T., Chua-Couzens J., Butcher L.L., Bredesen D.E., Cooper J.D., Valletta J.S., Mobley W.C., Longo F.M. // *J. Neurosci.* 1997. V. 17. P. 7594–7605.
39. Sobrieviela T., Clary D.O., Reichardt L.F., Brandabur M.M., Kordower J.H., Mufson E.J. // *J. Comp. Neurol.* 1994. V. 350. P. 587–611.
40. Wu D., Hersh L.B. // *J. Neurochem.* 1994. V. 62. P. 1653–1663.
41. Blume A., Gilbert F., Wilson S., Farber J., Rosenberg R., Nirenberg M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1970. V. 67. P. 786–792.
42. Harris A.J., Dennis M.J. // *Science.* 1970. V. 167. P. 1253–1255.

Induction of Cholinergic Phenotype in Mouse Neuroblastoma Cells Using Nerve Growth Factor

A. A. Koryagina^a, O. A. Nedogreeva^a, A. A. Buyanova^a, Yu. S. Spivak^a,
A. P. Bolshakov^a, N. V. Gulyaeva^a, and M. Yu. Stepanichev^a

^a*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

Nerve growth factor (NGF) is a key factor of neuronal differentiation. NGF plays an important role in growth and differentiation of sensory and sympathetic neurons in the peripheral nervous system. In the mature brain, NGF is important for the maintenance of a cholinergic neuronal phenotype. Here, we studied whether NGF is sufficient to induce cholinergic phenotype in murine neuroblastoma cells, which are often used to model various physiological and pathological conditions. We detected expression of both TrkA and p75NGFR of NGF receptors in NB41A3 and Neuro2a neuroblastoma cells, two the most popular cell lines widely used to study the properties of cholinergic neurons in vitro. Treatment of both types of cell cultures with NGF did not induce in contrast to 8-Br-cAMP, which induced differentiation of Neuro2a cells with formation neuron-like morphology. Furthermore, we did not reveal the markers of cholinergic phenotype, such as ChAT or VACHT mRNA or protein in these cells, after NGF treatment. Thus, NB41A3 and Neuro2a cells cannot be used as an in vitro model of cholinergic cells because they do not differentiate and/or exhibit cholinergic phenotype in response to NGF stimulation.

Keywords: nerve growth factor, neuroblastoma cells, differentiation, choline acetyltransferase, vesicular acetylcholine transporter, acetylcholinesterase

МЕЛАНХОЛИЧЕСКАЯ ДЕПРЕССИЯ СОПРОВОЖДАЕТСЯ ПОВЫШЕННЫМ УРОВНЕМ ФАКТОРА РОСТА НЕРВОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ

© 2023 г. М. Г. Узбеков¹, *, С. Н. Шихов¹, В. В. Крюков¹,
В. В. Бриллиантова¹, В. Н. Краснов¹

¹Московский НИИ психиатрии – филиал НМИЦПН
им. В.П. Сербского Минздрава РФ, Москва, Россия

Поступила в редакцию 09.06.2023 г.

После доработки 10.06.2023 г.

Принята к публикации 11.06.2023 г.

Целью работы было изучение уровня фактора роста нервов (ФРН) в сыворотке крови больных меланхолической депрессией. Обследованная группа состояла из 23 больных. При поступлении в клинику у больных до начала терапии уровень ФРН был достоверно выше – 278.28 пг/мл сыворотки по сравнению с контролем (239.51 ± 22.15) ($p < 0.05$) соответственно. Мы полагаем, что повышенный уровень ФРН в сыворотке крови у больных меланхолической депрессией может быть связан с нарушением функционирования ГЭБ и повышением его проницаемости для нейротропного фактора.

Ключевые слова: фактор роста нервов, меланхолическая депрессия, сыворотка крови

DOI: 10.31857/S1027813323040234, **EDN:** OQXYNH

В настоящее время депрессия является очень сложной медико-социальной проблемой, которая будет только углубляться в последующие годы. Исследование всех аспектов патогенетических механизмов депрессии является важной задачей медицины [1]. Нейротропные факторы могут влиять на аффективное поведение, включая депрессию, тревогу и тоску [2].

Фактор роста нервов (ФРН) [nerve growth factor (NGF)] является нейротрофическим фактором, регулирующим выживаемость и пролиферацию определенных нейронов в центральной и периферической нервной системе. Он выполняет медиаторные функции во многих биологических процессах в организме млекопитающих [3]. При этом он проявляет нейротрофические [4], иммунотрофические [5] и метаболитические [6] эффекты.

ФРН синтезируется в виде предшественника (proNGF) с молекулярным весом в 130 kD, который является комплексом трех белков: α -NGF, β -NGF и β -NGF, при этом последняя функционирует как сериновая протеаза, которая отсекает субъединицу, высвобождая зрелый (mature) ФРН с молекулярным весом в 26 kD. Эта форма ФРН является биологически активной мультифункциональной сигнальной молекулой [3, 5, 7]. Следует

подчеркнуть, что работы по исследованию ФРН в доступной нам отечественной литературе отсутствуют.

Цель исследования – исследование уровня ФРН в крови больных меланхолической депрессией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основная группа состояла из 23 больных в возрасте от 20 до 50 лет с диагнозом депрессивный эпизод умеренной степени тяжести в рамках биполярного аффективного расстройства – F31.3 по диагностическим критериям МКБ-10 [10-е издание, клинические модификации (ICD-10-CM)]. В соответствии с введенными международными критериями [The Criteria for Melancholic Features Specifiers, The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fourth Edition/Test Revision (DSM-IV-TR)] данное состояние может быть квалифицировано как “меланхолическая депрессия” в депрессивной фазе биполярного аффективного расстройства второго типа (БАР-II).

Контрольная группа состояла из 11 здоровых добровольцев.

Психометрия эмоционального расстройства проводилась с помощью психометрического шкалы Гамильтона для оценки депрессии (HDRS-21) и тревоги (HARS) [8]. Обследование проводилось

* Адресат для корреспонденции: 107076, Москва, Потешная ул., д. 3. e-mail: uzbekovmg@gmail.com.

в первый день поступления пациента в стационар до начала активного фармакологического лечения.

Критериями исключения являлись расстройство шизофренического спектра, психотический уровень депрессивного синдрома, высокий риск суицидального поведения, аддиктивные состояния, эпилепсия и эпилептиформные состояния в анамнезе, наличие деменции или обострения соматоневрологических заболеваний.

Все обследуемые дали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование было проведено в соответствии с Хельсинской декларацией и решением локального этического комитета МНИИП (№ 16, 13.03.2017 и № 42/2, 24.04.2023).

Концентрацию ФРН в сыворотке крови определяли методом ELISA с набором “Human Nerve Growth Factor” (Cusabio Technology LLC, USA).

Статистический анализ проводили при помощи Wilcoxon–Mann–Whitney *U*-теста. Различия рассматривались как достоверные при значении $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

До начала терапии средний балл по шкале Гамильтона для оценки депрессии (HDRS) у пациентов составлял 23.5 ± 5.8 балла, что соответствовало тяжелой депрессии. Средние значения шкалы тревоги (HARS) в основной группе составили 18.3 ± 5.9 балла, что соответствовало умеренно выраженной тревоге.

В контрольной группе здоровых добровольцев содержание ФРН в сыворотке крови составляло 239.51 ± 22.15 пикограмм/мл сыворотки. При поступлении в клинику у больных с меланхолической депрессией (БАР-II) уровень ФРН был достоверно выше -278.28 пг/мл сыворотки – по сравнению с контролем (239.51 ± 22.15) ($p < 0.05$) соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, в настоящей работе было установлено, что у больных меланхолической депрессией (БАР-II) исходный уровень ФРН до начала лечения был достоверно повышен по сравнению с контрольными показателями. Наши данные отличаются от имеющихся в литературе результатов. Анализ литературы показал, что уровень ФРН в сыворотке крови при депрессиях или не изменялся [10], или был достоверно снижен [3, 9, 11–13].

Следует отметить, что ни в одной из процитированных работе не было попыток объяснения, чем же вызвано снижение уровня ФРН.

Ранее мы установили, что при меланхолической депрессии в сыворотке крови был досто-

верно повышен уровень цилиарного нейротрофического фактора (ЦНТФ) [14]. Нами было предположено, что повышение уровня ЦНТФ в сыворотке крови связано с нарушением состояния гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) и его утечкой через барьер из паренхимы головного мозга в кровь.

Мы полагаем, что повышенный уровень ФРН в сыворотке крови у больных меланхолической депрессией также может быть связан с нарушением функционирования ГЭБ и повышением его проницаемости для нейротропного фактора, что сопровождается нарастанием уровня ФРН в сыворотке крови.

В литературе имеются данные, указывающие на повреждение ГЭБ при депрессиях [15, 16]. Этому способствуют, по нашему мнению, окислительный стресс [17] и нейровоспаление [18]. Повышенный уровень окислительного стресса ведет к дисфункции митохондрий, активации свободно радикальных реакций и повреждению ГЭБ [17]. Более того, активированные астроциты продуцируют нейротоксические молекулы: в частности простагландин E2 и провоспалительные цитокины [18], которые также влияют на проницаемость гемато-энцефалического барьера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследования показали, что меланхолическая депрессия сопровождается достоверно повышенным уровнем фактора роста нервов. Эти данные в корне отличаются от данных зарубежной литературы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках научной темы госзадания ФГБУ “НМИЦ ПН им. В.П. Сербского” Минздрава России “Разработка стационарных и динамических прогностических маркеров расстройств аффективного спектра и шизоаффективного расстройства на основе клинико-патогенетических, нейробиологических и психопатологических исследований” 2021–2023 гг. Регистрационный номер: 121041300179-3.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией о медицинских исследованиях с участием людей и заключением локального этического комитета Московского научно-исследовательского института психиатрии (№ 16, 13.03.2017 и № 41/2, 24.04.2023).

Информированное согласие. Все больные и здоровые добровольцы дали информированное согласие на участие в исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Краснов В.Н.* // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2012. Т. 112. Вып. 2. Депрессия. С. 3–11.
2. *Levy M., Boulle F., Steinbusch H., Hove D., Kenis G., Lanfumey L.* // *Psychopharmacology*. 2018. V. 235. P. 2195–2220.
3. *Ciafre S., Ferraguti G., Tiresa P., Iannitelli A., Ralli M., Greco A., Chaldakov G., Rosso P., Fico E., Messina M., Carito V., Tarani L., Ceccanti M., Fiore M.* // *Riv. Psichiatr.* 2020. V. 55. P. 4–15.
4. *Sofroniew M., Howe C., Mobley W.* // *Annu. Rev. Neurosci.* 2001. V. 24. P. 1217–1281.
5. *Fiore M., Chaldakov G., Aloe L.* // *Rev. Neurosci.* 2009. V. 20. P. 133–45.
6. *Chaldakov G., Fiore M., Stankulov I.* // *Prog. Brain Res.* 2004. V. 146. P. 279–289.
7. *Chao M.* // *J. Neurosci. Res.* 2000. V. 59. P. 353–355.
8. *Hamilton M.* // *Handbook of Anxiety Disorders* / Eds. Last C., Hersen M. Oxford: Pergamon Press, 1988. P. 143–155.
9. *Rao S., Martínez-Cengotitabengoa M., Yao Y., Guo Z., Xu Q., Li S., Zhou X., Zhang F.* // *J. Psychiatric Research.* 2017. V. 86. P. 39–45
10. *Liu X., Zhang T., He S., Hong B., Peng D., Su H., Li F., Tang Y., Lin Z., Fan Y., Jiang K.* // *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2014. V. 15. № 10. P. 835–840.
11. *Diniz B., Teixeira A., Machado-Vieira R., Talib L., Gattaz W., Forlenza O.* // *Am. J. Geriatr. Psychiatry.* 2013. V. 21. P. 493–496
12. *Wiener C., Ferreira S., Moreira F., Bittencourt G., Oliveira J., Molina M., Jansen K., Souza L., Lara D., Portela L., Silva R., Osés J.* // *J. of Affective Disorders.* 2015. V. 184. P. 245–248.
<https://doi.org/10.1016/j.jad.2015.05.067>
13. *Guo H., Ren Y., Huang B., Wang J., Yang X., Wang Y.* *Hindawi Genetics Research.* 2022. V. 2022. Article ID 1097982. 5 p.
14. *Узбеков М.Г., Шухов С.Н., Крюков В.В., Краснов В.Н., Стрелкова И.М., Узбекова Д.Г.* // *Сибирский вестник психиатрии и наркологии.* 2020. Т. 3. С. 5–10.
15. *Patel J., Frey B.* // *Neural Plasticity.* 2015. V. 2015. Article ID 708306. 12 p.
16. *Morris G., Fernandes B., Puri B., Walker A., Carvalho A., Berk M.* // *Aust. N Z J. Psychiatry.* 2018. V. 52. P. 924–948.
17. *Узбеков М.Г.* // *Социальная и клиническая психиатрия.* 2022. Т. 32. С. 83–87.
18. *Максимова Н.М., Булгакова Т.С., Узбеков М.Г.* // *Социальная и клиническая психиатрия.* 2019. Т. 29. С. 71–77.

Melancholic Depression is Followed by the Increased Serum Nerve Growth Factor Level

M. G. Uzbekov^a, S. N. Shikhov^a, V. V. Krjukov^a, V. V. Brilliantova^a, and V. N. Krasnov^a

^aMoscow Research Institute of Psychiatry, Moscow, Russia

The aim of the work was to investigate the nerve growth factor (NGF) level in the blood serum in patients with melancholic depression (MD). The investigated group consists of 23 patients. At admission in the clinic (before any antidepressive treatment) the NGF concentration in patient's serum was 278.28 ± 43.68 pg/mL that was significantly higher in comparison with controls 239.51 ± 22.15 pg/mL, ($p < 0.05$), respectively. It is supposed, that the increased NGF level in serum of the MD patients can be connected with the impairment of the functioning of the brain-blood barrier and the increase of its permeability for the NGF.

Keywords: nerve growth factor, melancholic depression, blood serum