

ISSN 1027-8133

Том 41, Номер 1

Январь - Февраль - Март
2024



НЕЙРОХИМИЯ



НАУКА

— 1727 —

СОДЕРЖАНИЕ

Том 41, номер 1, 2024

Периферические биохимические маркеры заболеваний мозга

(спецвыпуск)

Редактор М. Г. Узбекиков

Обзоры

Перспективные маркеры нейровоспаления при шизофрении

А. В. Сахаров, С. Е. Голыгина

5

Клиническая нейрохимия

Тревожная и меланхолическая депрессии сопровождаются разнонаправленными изменениями конформации альбумина сыворотки крови

М. Г. Узбекиков, Н. В. Смолина, Т. И. Сырейщикова, Н. М. Максимова, С. Н. Шихов, Г. Е. Добрецов, В. В. Бриллиантова, В. В. Крюков

14

Маркеры воспаления, энергетического и глутаматного метаболизма, антиоксидантной защиты у пациентов с юношескими депрессиями

С. А. Зозуля, О. К. Савушкина, Т. А. Прохорова, Е. Б. Терешкина, И. С. Бокша, М. А. Омельченко, Т. П. Ключник

19

Динамика соотношений пролактина и гормонов гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной оси у пациентов с шизофренией

Л. Н. Горобец, А. В. Литвинов, В. С. Буланов

29

Пилотное исследование экспрессии генов DRD3, GHRL, FTO, LEPR, INSIG2, GSTP1, ABCB1 в лейкоцитах периферической крови у больных шизофренией с метаболическим синдромом

А. С. Бойко, Д. З. Падерина, Е. В. Михалицкая, Е. Г. Корнетова, Н. А. Бохан, С. А. Иванова

37

Регулярные статьи

Обзоры

Стрессорные воздействия и когнитивная деятельность: поиск мишеней и общих механизмов с использованием мутантов дрозофилы

Д. М. Каровецкая, А. В. Медведева, Е. В. Токмачева, С. А. Васильева, А. В. Реброва, Е. А. Никитина, Б. Ф. Щеголев, Е. В. Саватеева-Попова

44

Цилиарный нейротрофический фактор как потенциальный биомаркер церебральных патологий

А. А. Гудкова

55

Экспериментальные работы

Локализация экзосом стволовых клеток в головном мозге и культивируемых клетках мозга мыши

М. Г. Ратушняк, А. В. Родина, Д. А. Шапошникова, Е. Ю. Москалёва

62

Внеклеточные везикулы, секретируемые активированными клетками ТНР-1, влияют на экспрессию генов воспаления в органах *Danio rerio*

Д. Б. Самбур, О. В. Калинина, А. Д. Акино, П. В. Тирикова, М. А. Мигунова, Е. Е. Королева, А. С. Трулев, А. А. Рубинштейн, И. В. Кудрявцев, А. С. Головкин

76

Клиническая нейрохимия

Закономерности изменений некоторых нейроспецифических белков у пациентов с хронической ртутной интоксикацией в постконтактном периоде

Г. М. Бодиенкова, Е. В. Боклаженко

92

Contents

Vol. 41, no. 1, 2024

Peripheral Biochemical Markers of Brain Diseases

(Special Issue)
Ed. M. G. Uzbekov

Review Articles

- Promising Markers of Neuroinflammation in Schizophrenia
A. V. Sakharov and S. E. Golygina 5
-

Clinical Neurochemistry

- Anxious and Melancholic Depression are Followed by Differently Directed Serum Albumin Conformation
M. G. Uzbekov, N. V. Smolina, T. I. Syreishchikova, N. M. Maximova, S. N. Shikhov, G. E. Dobretsov, V. V. Brilliantova, and V. V. Krjukov 14
- Markers of Inflammation, Energy and Glutamate Metabolism, and Antioxidant Defense in Patients with Adolescent Depression
S. A. Zozulya, O. K. Savushkina, T. A. Prokhorova, E. B. Tereshkina, I. S. Boksha, M. A. Omelchenko, and T. P. Klyushnik 19
- Dynamics of Ratios of Prolactin and Hormones of the Hypothalamic-Pituitary Thyroid Axis in Patients with Schizophrenia
L. N. Gorobets, A. V. Litvinov, and V. S. Bulanov 29
- Pilot Study of the DRD3, GHRL, FTO, LEPR, INSIG2, GSTP1, ABCB1 Genes Expression in Peripheral Blood Leukocytes in Schizophrenic Patients with Metabolic Syndrome
A. S. Boiko, D. Z. Paderina, E. V. Mikhailitskaya, E. G. Kornetova, N. A. Bokhan, and S. A. Ivanova 37
-

Regular Articles

Review Articles

- Stress Influences and Cognitive Activity: Search for Targets and General Mechanisms Using Drosophila Mutants
D. M. Karovetskaya, A. V. Medvedeva, E. V. Tokmacheva, S. A. Vasilyeva, A. V. Rebrova, E. A. Nikitina, B. F. Shchegolev, and E. V. Savvateeva-Popova 44
- Ciliary Neurotrophic Factor as a Potential Biomarker of Cerebral Pathologies
A. A. Gudkova 55
-

Experimental Articles

- Localization of the Stem Cells Exosomes in the Brain and in the Cultured Mouse Brain Cells
M. G. Ratushnyak, A. V. Rodina, D. A. Shaposhnikova, and E. Yu. Moskaleva 62

Extracellular Vesicles Secreted by the THP-1 Cells Influence on the Inflammation
Gene Expression in Zebrafish

*D. B. Sambur, O. V. Kalinina, A. D. Aquino, P. V. Tirikova, M. A. Migunova, E. E. Koroleva,
A. S. Trulyov, A. A. Rubinshtein, I. V. Kudryavtsev, and A. S. Golovkin*

76

Clinical Neurochemistry

Patterns of Changes in Certain Neurospecific Proteins in Patients with Post-Contact Period
Chronic Mercury Intoxication

G. M. Bodienkova and E. V. Boklazhenko

92

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МАРКЕРЫ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ

© 2024 г. А. В. Сахаров¹, *, С. Е. Голыгина¹

¹Читинская государственная медицинская академия, Чита, Россия

*E-mail: sakharov-chita@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.06.2023 г.

После доработки 24.06.2023 г.

Принята к публикации 25.06.2023 г.

В настоящее время не существует единой модели патогенеза шизофрении, при этом нейровоспаление считается одним из ключевых механизмов в развитии данного заболевания. Цель: проанализировать и обобщить литературные данные о роли маркеров нейровоспаления при шизофрении. По ключевым словам “нейровоспаление”, “цитокины”, “хемокины”, “микроциркуляция”, “микроглия”, “нейродеструкция”, “шизофрения” произведен поиск статей за период 1990–2003 гг. в базах данных PubMed и eLibrary.ru. В обзоре обсуждается комплексный подход к концепции нейровоспаления при шизофрении с учетом известных и перспективных маркеров данного нейробиологического процесса. Исследования, в том числе авторов статьи, свидетельствуют о существенной роли нарушений микроциркуляции и эндотелиальной дисфункции, цитокинов и хемокинов, нейродеструкции в механизмах развития и течения шизофрении. Представленные научные результаты требуют более детальной разработки для установления новых нейробиологических и патогенетических функций нейровоспаления при шизофрении.

Ключевые слова: нейровоспаление, цитокины, хемокины, нейродеструкция, микроциркуляция, шизофрения

DOI: 10.31857/S1027813324010015, **EDN:** GZIKHW

ВВЕДЕНИЕ

Современные патофизиологические исследования в области психиатрии свидетельствуют о наличии целого комплекса нейробиологических процессов при психических и поведенческих расстройствах, таких как нейровоспаление, нейродеструкция и нейрогенез [1]. Это диктует необходимость системного подхода к поиску биомаркеров, обладающих диагностической или прогностической ценностью.

При этом современные гипотезы развития многих психических расстройств отдают ведущую роль в этиопатогенезе именно нейровоспалению, так как у больных определяются в крови маркеры воспаления при активации иммунной системы [2, 3].

Под нейровоспалением понимается активация иммунокомпетентных клеток мозга, прежде всего микро- и астроглии [4]. Данный процесс сопровождается повышенной экскрецией медиаторов воспаления в центральную нервную систему, угнетением активности глутаматергических рецепторов, что ведет к снижению синаптической нагрузки коры префронтальной зоны и апоптозу нейронов [5]. При этом нейровоспаление сопряжено с системным воспалением [6, 7] и сопровождается

активацией иммунных факторов, повышением в крови уровня воспалительных медиаторов, факторов свертываемости, протеолитических ферментов и маркеров апоптоза [8, 9]. Установлено, что такая активация иммунной системы с определенным набором количественных и качественных иммунных маркеров тесно связана с психопатологической картиной заболевания, а уровень активации иммунной системы напрямую коррелирует с тяжестью выявляемых у пациентов психопатологических симптомов [10–13].

Кроме того, эндогенные и экзогенные провоцирующие факторы психических и поведенческих расстройств, такие как инфекционные, психогенные, социальные, токсические, взаимодействуют с генетическими и эпигенетическими факторами в пренатальном и постнатальном периодах. Это, в свою очередь, также может приводить к нарушению морфогенеза мозга, центральной и периферической иммунной активации, и развитию системного воспаления [14–16].

Безусловно, среди всех психических расстройств особое место занимает шизофрения, которая считается тяжелым психическим заболеванием, имеющим широкую распространенность, нередко



Рис. 1. Механизмы нейровоспаления при шизофрении.

ведущую к инвалидизации и сокращению продолжительность жизни [17, 18]. Учитывая многообразие клинической картины шизофрении, ее считают группой хронических психических заболеваний эндогенного происхождения, при этом отсутствуют специфические биологические маркеры болезни, а этиология и патогенез остаются недостаточно изученными [19].

В многочисленных исследованиях выдвинуто множество гипотез, механизмов и причин развития шизофрении [20–23], при этом нейровоспаление считается одним из ключевых факторов. Этот процесс зафиксирован на всем протяжении заболевания, независимо от формы течения и характера психопатологической симптоматики [24]. При этом имеются данные, что у лиц с шизофренией системное воспаление наиболее выражено при первом психотическом эпизоде [25].

В работах разных авторов описаны сдвиги в гуморальной и клеточной системах иммунитета. Происходит активация аутоиммунных механизмов [26–28]; увеличивается продукция цитокинов и других провоспалительных пептидов [29] с последующим повреждением гематоэнцефалического барьера, миграцией иммунных клеток; хроническая активация микроглии [30, 31], следствием чего является воспаление, нейродеградация и нарушения нейротрансмиссии [32, 33].

На сегодняшний день проведено достаточно исследований, отражающих роль иммунных

нарушений при различных формах шизофрении [34, 35]. Немаловажная роль отводится моноцитам / макрофагам, Т-лимфоцитам и продуцируемым ими цитокинам — их изучение легло в основу макрофагальной-Т-лимфоцитарной теории развития шизофрении [27, 28]. Так, установлено, что у пациентов увеличивается количество активных циркулирующих моноцитов / макрофагов [36], которые в результате повреждения гематоэнцефалического барьера мигрируют в центральную нервную систему (ЦНС) [31]. Активированные моноциты / макрофаги и клетки микроглии, которые являются аналогами описываемых клеток в ЦНС, синтезируют биологически активные провоспалительные вещества: цитокины: IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF-D; хемокины, а также рецепторы к ним. Эти факторы играют существенную роль в иммунном воспалении, которое дестабилизирует мозг и может приводить к развитию шизофрении [32]. Также происходит повышение уровня белков острой фазы, макрофагальных и лимфоцитарных провоспалительных факторов, включая клетки естественного и адаптивного иммунитета, а также противовоспалительных белков [37]. Взаимосвязь иммунологических, воспалительных нарушений с клиническими проявлениями шизофрении была показана в исследовании российских ученых [14], в котором были выявлены нейрокогнитивные и иммунные маркеры, такие как IL-10 IL-12p40, NGF, обладающие противовоспалительной регуляторной функцией.

В процессе нейровоспаления ведущая роль отводится микроглии, выполняющей функции различных иммунных клеток [38]. При этом процесс воспаления в головном мозге связан не только с активацией микроглии, но и сопровождается морфологическими и функциональными изменениями. Активированная микроглия выполняет функцию макрофагов головного мозга, быстро реагирует на патологические изменения в ЦНС и может способствовать синтезу повышенного количества провоспалительных цитокинов, вызывающих дисбаланс нейротрансмиттеров, а также различные цитотоксические факторы, способствующие нейродегенеративным процессам [29].

На наш взгляд, ведущие патофизиологические механизмы нейровоспаления при шизофрении можно представить следующим образом, представленным на рис. 1.

ИЗМЕНЕНИЯ В МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОМ РУСЛЕ

Предполагается, что все описанные выше иммунные нарушения сочетаются с расстройствами микроциркуляции крови и активацией перекисного окисления липидов [34, 35, 39, 40]. Так, при морфологическом исследовании головного мозга

пациентов, страдавших шизофренией, обнаружено существенное повышение проницаемости сосудистой стенки, выраженные изменения эндотелия и капиллярных мембран, что доказывает имевшееся повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера [41, 42]. Сосудистые нарушения были подтверждены нарушениями гемодинамических показателей в ЦНС у пациентов с шизофренией [43]. Выявлены нарушения тонуса сосудистой стенки, которые приводят к замедлению скорости кровотока в микроциркуляторном русле и более крупных сосудах [35, 44]. У ряда пациентов наблюдается вазоконстрикция и пониженное артериальное давление, что, предполагается, может приводить к усилению клинических нарушений, снижению терапевтического ответа и резистентности к терапии [45]. Нарушения в микрокровотоке закономерно сопровождаются явлениями гипоксии [42, 46]. Для оценки имеющихся изменений в общей микроциркуляции крови применялись метод реактивной гиперемии [47] и метод лазерной доплеровской флоуметрии [48]. По нашим данным, нарушения микроциркуляции крови у пациентов с параноидной формой шизофрении носят выраженный и распространенный характер, при этом изменения показателей в остром психотическом состоянии характеризуются чрезмерным усилением локальных механизмов регуляции микрокровотока и приводят к их патологическому действию в течение более длительного времени [48].

Помимо нарушений со стороны тока крови через микроциркуляторное русло, у больных шизофренией были обнаружены и многочисленные признаки эндотелиальной дисфункции [38, 49, 50]. Дисфункция эндотелия может проявиться дисбалансом в системе медиаторов, регулирующих агрегацию тромбоцитов, коагуляцию и фибринолиз, а также нарушением синтеза других биологически активных веществ [50]. У пациентов с первым психотическим эпизодом зафиксированы изменения показателей синтазы оксида азота [51], оксида азота и эндотелина-1 [38]. У первичных пациентов с шизофренией, не принимавших медикаментозное лечение, обнаружено повышение уровня sL-селектина [52]. На экспериментальных моделях животных было доказано, что не только сам патологический процесс может вызывать дисфункцию эндотелия, но также применение антипсихотических препаратов. Так, прием рисперидона может нарушать функцию эндотелия сосудов за счет активации молекул клеточной адгезии ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина [49].

Стоит отметить, что в настоящее время единого представления об изменениях в микроциркуляции крови, эндотелиальных факторах, состоянии и функционирующих циркулирующих в кровотоке эндотелиоцитов при шизофрении не сформировано, в том числе в условиях терапии

современными антипсихотиками. Дискутабелен вопрос о первичности данных изменений для повышения проницаемости гематоэнцефалического барьера, а также взаимосвязь с запуском и поддержанием процесса нейровоспаления.

ЦИТОКИНЫ

Общеизвестно, что ключевыми молекулами, оказывающими влияние на головной мозг при шизофрении, являются цитокины, продуцируемые множеством иммунных и неиммунных клеток. Цитокины производят активацию специфических рецепторов на различных клетках-мишенях, влияют на регуляцию процесса воспаления, включающего активацию, пролиферацию и дифференцировку иммунных клеток, а также увеличение кровоснабжения и проницаемости сосудов [53]. Поэтому изменения содержания провоспалительных цитокинов при шизофрении приводят к активации иммунных нарушений, сопровождающихся повышением проницаемости гематоэнцефалического барьера, что в свою очередь способствует процессам нейродеструкции и появлению в крови мозгоспецифических белков [54]. В обычных условиях цитокины в головном мозге практически не представлены, как и рецепторы к ним. В случае повреждающего воздействия на нервную ткань происходит быстрая активация провоспалительных цитокинов и их рецепторов, которая зависит от силы, вида и объема повреждения [55–57]. Одновременно секретируемые противовоспалительные цитокины снижают экспрессию провоспалительных цитокинов и уменьшают проявления воспаления. По этой причине цитокины могут участвовать как в нейродеструкции, так и в нейрорепарации, принимая участие в самых разнообразных иммунных реакциях в центральной нервной системе [58–60], в том числе при шизофреническом процессе [61].

Перспективным, на наш взгляд, является изучение содержания и роли ранее не исследуемых при шизофрении цитокинов. Так, одним из основных медиаторов острой фазы воспаления считается интерлейкин-6 (IL-6). Он секретируется макрофагами, фибробластами, клетками эндотелия сосудов, Т-клетками, глиальными клетками после их активации. IL-6 выполняет несколько важных ролей в центральной нервной системе: регуляция развития мозга, синаптической пластичности, сна и стресса. Некоторые авторы относят интерлейкин-6 к нейротрофинам [62]. Его рассматривают как потенциальный биомаркер шизофрении, поскольку уровень IL-6 повышен при первом эпизоде и рецидиве заболевания и снижается при лечении антипсихотиками. Повышенный уровень IL-6 также связан с длительностью заболевания [63, 64].

Интерлейкин-18 (IL-18) является провоспалительным цитокином, экспрессируемым многими клетками и обладает большим набором биологических эффектов. Он смещает равновесие цитокинов в пользу клеточного иммунитета, индуцируя образование IFN- γ , TNF- α , гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, IL-2; регулирует перфоринзависимую цитотоксичность и Fas-лиганд-опосредованный апоптоз. IL-18 увеличивает образование молекул адгезии, которые участвуют в механизмах клеточной миграции, что имеет большое влияние на формирование иммунного ответа. Кроме того, он стимулирует продукцию IFN- γ , представляя тем самым свое значение как участника противовоспалительной защиты организма [65].

Еще одним важным провоспалительным цитокином является фактор некроза опухоли- α (TNF- α). Он обуславливает нейровоспалительные процессы в головном мозге, регулирует множество биологических процессов: образование, рост и гибель клеток, участвует в формировании структуры органов и тканей, ремиелинизация нейронов [66]. Провоспалительные эффекты TNF- α представлены за счет влияния на содержание основных медиаторов воспаления: интерлейкина-6, интерлейкина-8, интерлейкина-18, хемокинов, циклооксигеназ-2 и 5, липоксигеназы [67].

В нашем раннем исследовании обнаружено, что при манифестации шизофренического психоза до назначения антипсихотической терапии отмечается повышение уровня интерлейкина-6 в 1.8 раза относительно группы здоровых при неотличимых от них показателей интерлейкина-18 и фактора некроза опухоли- α . Через 8 недель терапии содержание IL-6 имеет тенденцию к росту независимо от принимаемого антипсихотика. После лечения галоперидолом зафиксировано существенное повышение содержания TNF- α , а также тенденция к снижению IL-18. При приеме в течение 8 недель рисперидона уровень TNF- α сохраняется на уровне контрольных значений, величина IL-18 — уменьшается в 1.75 раза [68].

ХЕМОКИНЫ

Еще одними малоизученными при шизофреническом процессе представителями цитокинов являются хемокины. Они представляют собой семейство хемотаксических цитокинов, индуцирующих хемотаксис и миграцию лейкоцитов в органы и ткани, где их рецепторы и лиганды широко экспрессируются, как при физиологических, так и при патологических состояниях [69]. Известно, что хемокины в ЦНС выполняют широкий спектр различных функций. Так, эндотелиальные клетки гематоэнцефалического барьера при воспалении способны синтезировать некоторые хемокины,

такие как CCL 2, CCL 4 и CCL 5 [70, 71]. При этом наиболее признанной функцией хемокинов в головном мозге является регуляция нейровоспаления [72]. Многие хемокины синтезируются в активированных астроцитах и микроглиальных клетках, участвуя в процессах миграции иммунных клеток в ЦНС за счет увеличения проницаемости гематоэнцефалического барьера [71], что подтверждает их участие в процессах нейродеструкции, нейрорепарации и нейропластичности [73, 74]. Кроме того, они участвуют в сопровождении развития и пластичности нейронов, пролиферации, миграции и дифференцировке нейронных клеток-предшественников [75, 76], в регуляции нейроэндокринных функций [77, 78]. Имеются указания, что хемокины обладают нейромедиаторной и нейромодулирующей активностью [77, 79]. При этом точная роль хемокинов в механизмах развития шизофрении и влиянии на клиническую картину до сих пор неизвестна. Многочисленные доказательства указывают на периферическое провоспалительное состояние с экспрессией хемокинов и нейровоспаление, по крайней мере, у трети пациентов с шизофренией [80].

В литературе имеются данные, в которых установлена связь многих хемокинов включая CXCL8 (IL-8), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α) и CCL5 с психическими расстройствами, в том числе с шизофренией [81]. Так, было обнаружено повышенное содержание некоторых хемокинов с нейромимным регуляторным действием в плазме крови у пациентов с шизофренией, особенно у длительно болеющих данным расстройством: хемоаттрактантного белка-1 моноцитов (MCP-1/CCL2), воспалительного белка макрофагов-1 β (MIP-1 β /CCL4), эотаксина-1 (CCL11), хемокина, TARC/CCL17, производного хемокинов MDC/CCL22 [82].

Была обнаружена прямо пропорциональная взаимосвязь содержания провоспалительных хемокинов с когнитивными нарушениями у пациентов с расстройствами шизофренического спектра [83]. Рядом авторов была определена возможная корреляционная связь между уровнем хемокинов и терапией антипсихотиками, что предположительно может служить биомаркером положительного ответа на терапию [84]. Наиболее перспективными из хемокинов являются следующие.

CCL2 (MCP-1) — моноцитарный хемоаттрактантный белок — провоспалительный хемокин, модулирующий привлечение, миграцию и инфильтрацию макрофагов и моноцитов в места воспаления. Повышение уровня данного белка может быть связано с различными нейродегенеративными и нейровоспалительными процессами [85, 86]. Имеются данные, указывающие на участие CCL2 в высвобождении дофамина в ЦНС [87], что косвенно может указывать на его возможную роль в патогенезе шизофрении. В нашей работе уровень

CCL2 у больных первым эпизодом шизофрении оказался повышенным в 1.6 раза относительно контрольных значений [88].

CCL4 или макрофагальный воспалительный белок-1 β является хемоаттрактантом для естественных клеток-киллеров, моноцитов и других иммунных клеток. Данный хемокин участвует в поддержании хронического воспаления, также имеются данные о его роли в процессе нейровоспаления [89, 90].

CCL11 (Eotaxin) – эозинофильный хемотаксический белок, предположительно связан с нейрогенезом и нейродегенерацией, так как способен влиять на нейрональные клетки и микроглию. CCL11 стимулирует активацию микроглии, потенцирует глутамат-индуцированную гибель нейронов. Повышение данного белка было описано при шизофрении и имеет связь с тяжестью психопатологических и когнитивных расстройств [91].

CCL20 (MIP-3 α) – макрофагальный белок воспаления 3 – регулирует миграцию и активацию лейкоцитов, в том числе моноцитов/макрофагов, в очаг воспаления, которые осуществляют воспалительные реакции под влиянием провоспалительных цитокинов. По данным литературы, у больных шизофренией, особенно пожилого возраста, наблюдается повышение уровня данного хемокина [32].

Еще два хемокина: CXCL1 (GRO- α) – связанный с ростом онкоген α , CXCL5 (ENA-78) – пептид, активирующий нейтрофилы эпителиального происхождения, – являются мощными хемоаттрактантами нейтрофилов в ЦНС за счет взаимодействия с CXCR2-рецептором, поэтому они участвуют в запуске процессов нейровоспаления [92, 93]. Они в большом количестве определялись в тканях мозга при шизофрении [94].

CXCL8 (IL-8) – провоспалительный хемокин, индуцирующий хемотаксис гранулоцитов, моноцитов/макрофагов и лимфоцитов в очаг воспаления. Активирует нейтрофилы, усиливает выработку провоспалительных цитокинов мононуклеарными клетками, неблагоприятно влияет на функции микроциркуляторного русла, способствует окислительному повреждению эндотелия. По единичным данным, у пациентов при шизофрении отмечается повышение данного показателя в сыворотке крови и тканях головного мозга [95, 96].

CXCL9 (MIG) – монокин, индуцируемый гамма-интерфероном (IFN- γ) вовлечен в нейрон-глиальное взаимодействие [97], экспрессируется на астроцитах и эндотелиальных клетках микрососудов головного мозга человека [96], участвует в запуске нейровоспаления [98]. Данные о роли CXCL9 при шизофрении нами не найдены.

CXCL10 (IP-10) – интерферон-гамма индуцированного белка 10 – секретируется макрофагальными

клетками, усиливает проницаемость гематоэнцефалического барьера, запускает эксайтотоксичность [99], участвует в рекрутировании микроглии [100], реализуя нейровоспаление и нейродеструкцию.

Таким образом, хемокины выполняют разнообразные нейробиологические функции в ЦНС, включая нейровоспаление и изменение нейротрансмиссии [101]. По нашим данным, при манифестации шизофренического психоза присутствует повышение в крови уровня следующих хемокинов: CCL4 (MIP-1 β) – в 1.1 раза, CXCL9 (MIG) – в 1.4 раза, CCL11 (Eotaxin), CXCL5 (ENA-78), CXCL10 (IP-10) – в 1.5 раза, CXCL1 (GRO- α) – в 1.6 раза, CCL20 (MIP-3 α) – в 2.1 раза, CXCL8 (IL-8) – в 21.0 раз относительно показателей у здоровых лиц [102].

В одном из исследований была высказана гипотеза, что имеется связь между активацией материнского иммунитета и риском развития шизофрении. Предполагается, что цитокины, хемокины, антитела и белки острой фазы воспаления высвобождаются в кровоток матери, проникают через гематоэнцефалический барьер плода, активируя клетки микроглии, тем самым запуская процесс нейровоспаления. При этом нейровоспаление может влиять на нормальное созревание мозга. Данные маркеры активации микроглии были обнаружены в высокой концентрации в мозге людей с шизофренией [103].

Еще одними перспективными маркерами нейровоспаления являются VILIP-1, TREM-1 и RAGE.

VILIP-1 – визинин-подобный белок 1 – имеет большое значение в опосредовании кальций-зависимой нейротоксичности ввиду того, что его функции заключаются в модуляции многочисленных путей передачи клеточных сигналов, в том числе посредством ионных каналов и рецепторов, включая каналы кальция. Данные функции VILIP-1 могут приводить к повреждению и гибели нейронов [104].

TREM-1 (запускающий рецептор, экспрессируемый на миелоидных клетках) принадлежит к семейству, относящемуся к рецепторам естественных клеток-киллеров, и экспрессируется на поверхности нейтрофилов миелоидных клеток, моноцитов и макрофагов. Схожим действием обладает TREM-2. Это трансмембранный рецептор, который экспрессируется преимущественно микроглией центральной нервной системы. Немногочисленные исследования указывают на участие TREM-1 и TREM-2 в процессе нейровоспаления [105].

RAGE – рецептор конечных продуктов гликирования белков – трансмембранный гликопротеин типа I, принадлежащий к семейству иммуноглобулинов. Имеются описания связи между sRAGE и нейродегенерацией за счет развития нейровоспаления, которое ассоциировано с активацией

клеток микроглии и развитием окислительного стресса, а также с нарушением нейрон-астроглиальных взаимодействий [106].

В проведенном нами исследовании было установлено, что при манифестации шизофрении присутствует повышение в крови относительно уровня значений здоровых людей триггерного рецептора миелоидных клеток 1 (sTREM-1) – в 2.2 раза, рецептора конечных продуктов гликозилирования (sRAGE) – в 1.75 раза, визинин-подобного белка 1 (VILIP-1) – в 1.6 раза. При этом содержание мозгового нейротрофического фактора (BDNF) оказалось сниженным в 1.25 раза. При этом, через 8 недель лечения как галоперидолом, так и рисперидоном наблюдается рост содержания в крови пациентов VILIP-1, а также снижение sRAGE [88].

Безусловно, представленные маркеры нейровоспаления являются далеко не единственными, перечень их весьма широк, но они требуют активного изучения при расстройствах шизофренического спектра, в том числе с учетом разной антипсихотической терапии [107, 108], которую получают пациенты. Это в перспективе может иметь серьезное практическое значение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем обзоре продемонстрировано разнообразие взглядов на концепцию нейровоспаления при шизофрении, представлены как хорошо исследованные, так и перспективные маркеры данного нейробиологического процесса при этом заболевании. Результаты многочисленных исследований, в том числе авторов статьи, свидетельствуют о весомой роли нарушений микроциркуляции и эндотелиальной дисфункции, цитокинов и хемокинов, процесса нейродеструкции в механизмах развития и течения расстройств шизофренического спектра, в том числе при психофармакотерапии и во взаимосвязи с клиническими проявлениями. Однако эти фундаментальные научные данные требуют дальнейшего подтверждения, в результате, возможно, раскроются новые нейробиологические и патогенетические функции маркеров нейровоспаления при шизофрении.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Обзор подготовлен в рамках исследования, одобренного в локальном этическом комитете ФГБОУ ВО “Читинская государственная

медицинская академия” Минздрава России 10.11.2021 (протокол № 117).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Галкин С.А., Левчук Л.А., Симуткин Г.Г., Иванова С.А., Бохан Н.А.* // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2023. Т. 123. № 3. С. 82–87.
2. *Troubat R., Barone P., Leman S., Cressant A., Atanasova B., Brizard B., El Hage W., Surget A., Belzung C., Vincent Camus V.* // Eur. J. Neurosci. 2021. V. 53. № 1. P. 151–171.
3. *Клюшник Т.П., Зозуля А., Олейчик И.В.* Биологические маркеры шизофрении: поиск и клиническое применение. Новосибирск: СО РАН, 2017. С. 34–46.
4. *Клюшник Т.П.* // Сборник материалов конференции “Психическое здоровье человека и общества. Актуальные междисциплинарные проблемы”. 2018. С. 393–400.
5. *Паршина А.Ю., Подсеваткин В.Г., Кирюхина С.В., Лабунский Д.А., Юрасова Е.Ю.* // Материалы всероссийской с международным участием научной конференции “Огородские чтения”. 2022. С. 336–345.
6. *Dunn G.A., Loftis J.M., Sullivan E.L.* // Pharmacol. Biochem. Behav. 2020. V. 196. P. 172981.
7. *Vallee A.* // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 5. P. 2810.
8. *Yuan N., Chen Y., Xia Y., Dai J., Liu C.* // Transl. Psychiatry. 2019. V. 9. № 1. P. 233.
9. *Najjar S., Steiner J., Najjar A., Bechter K.* // J. Neuroinflammation. 2018. V. 13. № 1. P. 40.
10. *Клюшник Т.П., Смулевич А.Б., Зозуля С.А., Борисова П.О., Лобанова В.М.* // Психиатрия. 2022. Т. 20. № 1. С. 17–25.
11. *Клюшник Т.П., Смулевич А.Б., Зозуля С.А., Романов Д.В., Лобанова В.М.* // Психиатрия. 2023. Т. 21. № 3. С. 6–12.
12. *Зозуля С.А., Сизов С.В., Олейчик И.В., Клюшник Т.П.* // Социальная и клиническая психиатрия. 2019. Т. 29. № 4. С. 5–13.
13. *Клюшник Т.П., Андросова Л.В., Зозуля С.А., Отман И.Н., Никитина В.Б., Ветлугина Т.П.* // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. 2018. № 2(99). С. 64–69.
14. *Малашенкова И.К., Ушаков В.Л., Захарова Н.В., Крынский С.А., Огурицов Д.П., Хайлов Н.А., Чекулаева Е.И., Ратушный А.Ю., Карташев С.И., Костюк Г.П., Дидковский Н.А.* // Современные технологии в медицине. 2022. Т. 13. № 6. С. 24–35.
15. *Miller B.J., Goldsmith D.R.* // Neuropsychopharmacology. 2017. V. 42. № 1. P. 299–317.
16. *Батурина М.В., Боев О.И., Бейер Э.В., Яровицкий В.Б., Харитонова Я.П., Батуринов В.А.* //

- Забайкальский медицинский вестник. 2023. № 1. С. 10–16.
17. *Laurson T.M., Nordentoft M., Mortensen P.B.* // *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 2014. V. 10. P. 425–448.
 18. *Corsi-Zuelli F.M.D.G., Brognara F., Quirino G.F.D.S., Hiroki C.H., Fais R.S., Del-Ben C.M., Ulloa L., Salgado H.C., Kanashiro A., Loureiro C.M.* // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. P. 618.
 19. *Шмакова А.А., Семина Е.В., Нейфельд Е.А., Цыганков Б.Д., Караязур М.Н.* // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2023. Т. 123. № 2. С. 26–36.
 20. *Орлова В.А.* // Российский психиатрический журнал. 2003. № 1. С. 31–35.
 21. *Карлсон А., Лекрубьер И.* Прогресс дофаминовой теории шизофрении: справочное пособие для врачей. Швеция, 2003. С. 104.
 22. *Малашенкова И.К., Крынский С.А., Огурцов Д.П., Мамошина М.В., Захарова Н.В.* // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2018. Т. 118. № 12. С. 72–80.
 23. *Шмуклер А.Б.* // Шизофрения. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2021. С. 176.
 24. *Костюкова А.Б., Мосолов С.Н.* // Современная терапия психических расстройств. 2013. № 4. С. 8–17.
 25. *Ushakov V.L., Sharaev M.G., Malashenkova I.K., Krynskiy S.A., Kartashov S.I., Orlov V.A., Malakhov D.G., Hailov N.A., Ogurtsov D.P., Zakharova N.V., Didkovsky N.A., Maslennikova A.V., Arkhipov A. Yu., Strelets V.B., Arsalidou M., Velichkovsky B.M., Kostyuk G.P.* // *Procedia. Comput. Sci.* 2018. V. 145. P. 596–603.
 26. *Khandaker G.M., Dantzer R., Jones P.B.* // *Psychol. Med.* 2017. V. 47. № 13. P. 2229–2237.
 27. *Smith R.S.* // *Med. Hypotheses.* 1992. V. 39. № 3. P. 248–57.
 28. *Nikkilä H.V., Müller K., Ahokas A., Miettinen K., Ritmon R., Andersson L.* // *J. Psychiatry.* 1999. V. 156. № 11. P. 1725–1729.
 29. *Monji A., Kato T., Kanba S.* // *Psychiatry and Clinical Neurosciences.* 2009. V. 63. P. 257–265.
 30. *Hafizi S., Tseng H.H., Rao N., Selvanathan T., Kenk M., Bazinet R., Suridjan I., Wilson A., Meyer J., Remington G., Houle S., Rusjan P., Mizrahi R.* // *Am.J. Psychiatry.* 2017. V. 174. № 2. P. 118–124.
 31. *Takahashi V., Yu Z., Sakai M., Tomita H.* // *Front. Cell. Neurosci.* 2016. V. 10. P. 144.
 32. *Васильева Е.Ф., Брусов О.С.* // Психиатрия. 2020. Т. 18. № 3. С. 76–85.
 33. *Голимбет В.Е., Щербатых Т.В., Абрамова З.И.* // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2000. Т. 101. № 10. С. 40–41.
 34. *Голимбет В.Е., Митюшина З.Г., Носиков В.В.* // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2001. Т. 101. № 54. С. 48–50.
 35. *Березовская М.А.* // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. 2011. № 4. С. 119–120.
 36. *Theodoropoulou S., Spanakos G., Vaxevanis C.N., Economou M., Gritzapis A.D., Papamichail M.P., Stefanis C.N.* // *Schizophr. Res.* 2001. V. 479. № 1. P. 13–25.
 37. *Neugebauer K., Hammans C., Wensing T., Kumar V., Grodd W., Mevissen L., Sternkopf M.A., Novakovic A., Abel T., Habel U., Nickl-Jockschat T.* // *Front. Psychiatry.* 2019. V. 10. P. 275.
 38. *Васильева А.И., Говорин Н.В.* // Забайкальский медицинский вестник. 2011. № 1. С. 26–32.
 39. *Рязанцева Н.В., Новицкий В.В.* // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2002. № 6. С. 36–42.
 40. *Лукаш А.И., Заика В.Г., Кучеренко А.С.* // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2002. № 9. С. 41–43.
 41. *Рачкаускас Г.С.* Харьков; Луганск: Елтон-2, 2004. С. 432.
 42. *Рачкаускас Г.С., Радионова С.И., Пащенко О.С.* // Журнал психиатрии и медицинской психологии. 2017. № 3. С. 14–20.
 43. *Okada F., Tokumitsu Y., Hoshi Y., Tamura M.* // *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience.* 1994. V. 244. № 1. P. 17–25.
 44. *Berrocal-Izquierdo N., Bioque M., Bernardo M.* // *Psychopharmacology.* 2017. V. 32. № 2. P. 80–86.
 45. *Смирнов В.К.* Микроциркуляция в патогенезе и клинике шизофрении с разными формами течения. М., 2001. С. 151.
 46. *Альтман А.Л.* Проблема выздоровления и компенсации при шизофрении. М.: Медицина, 2013. С. 128.
 47. *Israel A.K., Seeck A., Boettger M.K., Rachow T., Berger S., Voss A., Bär K.J.* // *Schizophrenia Research.* 2011. V. 128. № 1–3. P. 44–50.
 48. *Сахаров А.В., Озорнин А.С., Гольгина С.Е., Виноградова А.О., Швеиц М.С.* // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2018. Т. 118. № 2. С. 74–76.
 49. *Aboul-Fotouh S., Elgayar N.* // *Physiol. Pharmacol.* 2013. V. 91. № 12. P. 1119–1126.
 50. *Васина Л.В., Петрищев Н.Н., Власов Т.Д.* // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2017. Т. 16. № 1. С. 4–15.
 51. *Burghardt K., Grove T., Ellingrod V.* // *Journal of Psychopharmacology.* 2014. V. 28. № 4. P. 349–356.
 52. *Iwata Y., Suzuki K., Nakamura K., Matsuzaki H.* // *Schizophr. Res.* 2007. V. 89. № 1–3. P. 154–160.
 53. *Козловский В.Л.* // Фармакология и токсикология. 1990. Т. 53. № 5. С. 7–13.
 54. *Сахаров А.В., Мындускин И.В., Терешков П.П.* // Сибирский вестник психиатрии и наркологии. 2020. № 4. С. 15–20.

55. Nilupul Perera M., Ma H.K., Arakawa S., Howells D.W., Markus R., Rowe C.C., Donnan G.A. // *J. Clin. Neurosci.* 2006. V. 13. № 1. P. 1–8.
56. Minami M., Satoh M. // *Life Sci.* 2003. V.74. № 2–3. P. 321–327.
57. Simi A., Tsakiri N., Wang P., Rothwell N.J. // *Biochem. Soc. Trans.* 2007. V.35. № 5. P. 1122–1126.
58. Szelényi J., Vizi E. // *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2007. V. 1113. P. 311–324.
59. Kirkpatrick B., Miller B.J. // *Schizophrenia Bulletin.* 2013. V. 39. № 6. P. 1174–1179.
60. Sansonetti P.J. // *Nature Immunology.* 2006. V. 7. № 12. P. 1237–1242.
61. Mednova I.A., Boiko A.S., Kornetova E.G., Semke A.V., Bokhan N.A., Ivanova S.A. // *Life.* 2022. № 12. P. 1972.
62. Lee B.H., Kim Y.K. // *Neuropsychobiology.* 2009. V. 59. № 1. P. 51–58.
63. Misiak B., Staczykiewicz B., Kotowicz K., Rybakowski J., Samochowiec J., Frydecka D. // *Schizophr. Res.* 2018. V. 192. P. 16–29.
64. Sommer I.E., Westrhenen R., Begemann M.J., Witte L., Leucht S., Kahn R. // *Schizophr. Bull.* 2014. V. 40. P. 181–191.
65. Якушенко Е.В., Лопатникова Ю.А., Сенников С.В. // *Медицинская иммунология.* 2005. № 7. С. 355–364.
66. Воронина Е.В., Лобанова Н.В., Яхин И.Р., Романова Н.А., Серегин Ю.А. // *Медицинская иммунология.* 2018. № 20. С. 797–806.
67. Puren A.J., Fantuzzi G., Gu Y., Su M.S., Dinarello C.A. // *J. Clin. Invest.* 1998. V. 101. P. 71121.
68. Мындускин И.В., Сахаров А.В., Терешков П.П., Голыгина С.Е. // *Психическое здоровье.* 2022. Т. 17. № 22. С. 20–25.
69. Bajetto A., Bonavia R., Barbero S., Schettini G. // *Journal of neurochemistry.* 2002. V. 82. № 6. P. 1311–1329.
70. Quandt J., Dorovini-Zis K. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004. V. 63. P. 350–362.
71. Dimitrijevic O.B., Stamatovic S.M., Keep R.F., Andjelkovic A.V. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2006. V. 26. P. 797–810.
72. Jaerve A., Muller H.W. // *Cell Tissue Res.* 2012. V. 349. P. 229–248.
73. Kettenmann H., Kirchhoff F., Verkhratsky A. // *Neuron.* 2013. V. 77. P. 10–18.
74. Biber K., Neumann H., Inoue K., Boddeke H. // *Trends Neurosci.* 2007. V. 30. P. 596–602.
75. Tran P.B., Banisadr G., Ren D., Chenn A., Miller R.J. // *J. Comp. Neurol.* 2007. V. 500. P. 1007–1033.
76. Miller R.J., Rostene W., Apartis E., Banisadr G., Biber K., Milligan E.D., White F.A., Zhang J.J. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. P. 11792–11795.
77. Rostene W., Kitabgi P., Parsadaniantz S.M. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2007. V. 8. P. 895–903.
78. Verburg-van Kemenade B.M., Van der Aa L.M., Chadzinska M. // *Gen. Comp. Endocrinol.* 2013. V. 188. P. 94–101.
79. Stuart M.J., Singhal G., Baune B.T. // *Front Cell. Neuroscience.* 2015. V. 9. № 10. P. 357–383.
80. Ermakov A., Mednova A., Boiko A.S., Buneva V.N., Ivanova S.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 22; 24. № 3. P. 2215.
81. Stuart M.J., Baune B.T. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2014. V. 42. P. 93–115.
82. Hong S., Lee E.E., Martin A.S., Soontornniyomkij B., Soontornniyomkij V., Achim C.L., Reuter C., Irwin M.R., Eyler L.T., Jeste D.V. // *Schizophr. Res.* 2017. V. 181. P. 63–69.
83. Klaus F. // *Journal of psychiatric research.* 2021. V. 138. P. 139–145.
84. Lin Y. // *Shanghai Arch. Psychiatry.* 2017. V. 29. № 5. P. 287–294.
85. Semple B.D., Kossmann T., Morganti-Kossmann M.C. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2010. V. 30. № 3. P. 459–73.
86. Jarnagin K., Grunberger D., Mulkins M., Wong B., Hemmerich S., Paavola C., Bloom A., Bhakta S., Diehl F., Freedman R., McCarley D., Polsky I., Ping-Tsou A., Kosaka A., Handel T.M. // *Biochemistry.* 1999. V. 38. № 49. P. 16167–16177.
87. Guyon A., Skrzydelski D., De Giry I., Rovere C., Conductier G., Trocello J.M., Dauge V., Kitabgi P., Rostene W., Nahon J.L., Melik Parsadaniantz S. // *Neuroscience.* 2009. V. 162. № 4. P. 1072–1080.
88. Сахаров А.В., Мындускин И.В., Терешков П.П., Озорнин А.С., Голыгина С.Е. // *Российский психиатрический журнал.* 2021. № 4. С. 61–67.
89. Bystry R.S., Aluvihare V., Welch K.A., Kallikourdis M., Betz A.G. // *Nature Immunology.* 2001. V. 2. № 12. P. 1126–1132.
90. Harrison S., Thumm L., Nash T.E., Nutman T.B., O'Connell E.M. // *Clinical Infectious Diseases.* 2021. V. 72. № 9. P. 326–333.
91. Warren K.J., Wyatt T.A. // *J. Vis. Exp.* 2019. V. 151. P. 60060.
92. Marro B.S., Grist J.J., Lane T.E. // *J. Immunol.* 2016. V. 196. P. 1855–1864.
93. Wu F., Zhao Y., Jiao T. // *J. Neuroinflammation.* 2015. V. 12. P. 98.
94. Xu L., Qi X., Zhu C., Wan L. // *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2018. V. 14. P. 3393–3403.
95. Ушаков В.Л., Малашенкова И.К., Костюк Г.П., Захарова Н.В., Крынский С.А., Карташов С.И., Огурцов Д.П., Бравве Л.В., Кайдан М.А., Хайлов Н.А., Чекулаева Е.И., Дидковский Н.А. // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2020. Т. 120. № 11. С. 70–78.

96. Xia M.Q., Bacsikai B.J., Knowles R.B., Qin S.X., Hyman B.T. // *J. Neuroimmunol.* 2000. V. 108. № 1–2. P. 227–235.
97. Müller M., Carter S., Hofer M.J. // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2010. V. 36. № 5. P. 368–387.
98. Salmaggi A., Gelati M., Dufour A. // *J. Interferon Cytokine Res.* 2002. V. 22. № 6. P. 631–640.
99. Sui Y., Stehno-Bittel L., Li S. // *Eur. J. Neurosci.* 2006. V. 23. № 4. P. 957–964.
100. Li H., Gang Z., Yuling H. // *J. Immunol.* 2006. V. 177. № 6. P. 3644–3656.
101. Прохоров А.С., Сахаров А.В., Голыгина С.Е. // *Психическое здоровье.* 2022. Т. 17. № 11. С. 100–110.
102. Сахаров А.В., Голыгина С.Е., Прохоров А.С., Терешков П.П. // *Нейрохимия.* 2023. Т. 40. № 1. С. 92–96.
103. Varichello T., Simoes L.R., Quevedo J., Zhang X.Y. // *Curr. Top. Behav. Neurosci.* 2020. V. 44. P. 161–205.
104. Burgoyne R.D. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2007. V. 8. № 3. P. 182–193.
105. Suárez-Calvet M., Morenas-Rodríguez E., Kleinberger G., Schlepckow K., Caballero M.Á., Franzmeier N., Capell A., Fellerer K., Nuscher B., Eren E., Levin J., Deming Y., Piccio L., Karch C., Cruchaga C., Shaw L., Trojanowski J., Weiner M., Ewers M., Haass C. // *Molecular Neurodegeneration.* 2019. V. 14. № 1. P. 1.
106. Galasko D., Bell J., Mancuso J.Y., Kupiec J.W., Sabagh M.N., van Dyck C., Thomas R.G., Aisen P.S. // *Neurology.* 2014. V. 82. № 17. P. 1536–1542.
107. Ermakov E.A., Dmitrieva E.M., Parshukova D.A., Smirnova L.P., Kazantseva D.V., Vasilieva A.R. // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2021. V. 2021. P. 8881770.
108. Камаева Д.А., Гончарова А.А. // *Психиатрия.* 2022. Т. 20. № S3 (2). С. 70–71.

Promising Markers of Neuroinflammation in Schizophrenia

A. V. Sakharov¹ and S. E. Golygina¹

¹*Chita State Medical Academy, Chita, Russia*

There is no single model for the pathogenesis of schizophrenia, but neuroinflammation is considered a key mechanism in the development of this disease. The aim of the study: to analyze and summarize the literature data on the role of neuroinflammation markers in schizophrenia. Using the keywords “neuroinflammation”, “cytokines”, “chemokines”, “microcirculation”, “microglia”, “neurodestruction”, “schizophrenia”, articles for the period 1990–2003 in the PubMed and e-Library.ru databases were searched. The review discusses an integrated approach to the concept of neuroinflammation in schizophrenia, taking into account known and promising markers. Studies, including those of the authors of the article, indicate a significant role of microcirculation disorders and endothelial dysfunction, cytokines and chemokines, neurodestruction in the mechanisms of development and course of schizophrenia. The presented results require more detailed development to establish new neurobiological and pathogenetic functions of neuroinflammation in schizophrenia.

Keywords: neuroinflammation, cytokines, chemokines, neurodestruction, microcirculation, schizophrenia

ТРЕВОЖНАЯ И МЕЛАНХОЛИЧЕСКАЯ ДЕПРЕССИИ СОПРОВОЖДАЮТСЯ РАЗНОНАПРАВЛЕННЫМИ ИЗМЕНЕНИЯМИ КОНФОРМАЦИИ АЛЬБУМИНА СЫВОРОТКИ КРОВИ

© 2024 г. М. Г. Узбеков¹, *, Н. В. Смолина¹, Т. И. Сырейщикова¹, Н. М. Максимова¹,
С. Н. Шихов¹, Г. Е. Добрецов¹, В. В. Бриллиантова¹, В. В. Крюков¹

¹Московский научно-исследовательский институт психиатрии Минздрава РФ, Москва, Россия

*E-mail: uzbekovmg@gmail.com

Поступила в редакцию 05.06.2023 г.

После доработки 06.06.2023 г.

Принята к публикации 07.06.2023 г.

Целью работы было изучение особенностей конформационных изменений молекулы альбумина сыворотки крови у больных тревожной и меланхолической депрессией в динамике фармакотерапии. Для исследования конформации альбумина был применен метод субнаносекундной лазерной разрешенной во времени флуоресцентной спектроскопии. Тревожная депрессия сопровождалась достоверным снижением величин трех амплитуд на альбумине сыворотки крови по сравнению с контролем. При меланхолической депрессии величины трех амплитуд на молекуле альбумина были достоверно повышены по сравнению с контролем. Эти данные указывают, что у больных тревожной и меланхолической депрессией происходили разнонаправленные изменения конформации альбумина.

Ключевые слова: тревожная депрессия, меланхолическая депрессия, альбумин сыворотки крови, субнаносекундная лазерная флуоресцентная спектроскопия, связывающие центры, амплитуды

DOI: 10.31857/S1027813324010022, EDN: GZHVJ

ВВЕДЕНИЕ

Депрессия является одной из наиболее распространенных болезней человека и одной из основных причин потери трудоспособности в мире. Это заболевание представляет собой самую главную клиническую, эмоциональную и социо-экономическую нагрузку на общество. В настоящее время около 300 миллионов человек по всему миру страдают от депрессии, а от 5 до 17% людей в популяции страдает от депрессии хотя бы один раз в жизни. В 1999 г. Всемирный банк на основании инициированного им исследования прогнозировал, что к 2020 г. заболеваемость депрессией возрастет во всех регионах мира и что депрессии должны выйти на второе место после сердечно-сосудистых заболеваний среди основных причин нетрудоспособности. Однако по прогнозу Всемирной организации здравоохранения от 2012 к 2030 г. депрессия будет ведущей причиной инвалидизации в мире [1, 2]. Но уже к концу 2000-х гг. депрессии стали основной причиной нетрудоспособности в Европе [3].

Депрессия – также фактор риска многих серьезных соматических заболеваний. Она усугубляет

их течение и создает риск развития осложнений и преждевременной смерти. Депрессии превратились в большую медико-социальную проблему, которая в ближайшие годы будет только обостряться. Поэтому всестороннее исследование депрессии и патогенетических механизмов этого заболевания становится одной из главных задач медицинской науки. Прогнозирование и оценка эффективности лечения депрессии по важности выдвигаются на первый план [4].

Трудности поиска новых эффективных методов диагностики, дифференциальной диагностики, прогноза и оценки эффективности терапии являются в значительной мере следствием непонимания этиологии и ограниченность в понимании патогенетических и патофизиологических механизмов развития психических расстройств.

В последние годы усилия исследователей сосредоточились на поиске биохимических и, в значительной степени меньшей степени, – биофизических маркеров основных психических заболеваний. Стало ясно, что важным звеном нарушения молекулярных процессов при развитии патологических

процессов в организме могут быть конформационные изменения белков, т.е. ориентация белковой молекулы в пространстве. К настоящему времени накопился значительный материал в пользу существования связи между конформацией белков и патологическими процессами в организме [5]. Стало очевидно, что для развития патологических процессов в организме важны не только изменения химической структуры белков, но не менее важными могут быть изменения конформации молекулы белка. Таким образом, белки с измененной конформацией могут приводить к “патологической” направленности биохимических и физико-химических процессов в организме и тем самым вызывать развитие заболеваний.

Альбумин – главный (до 50% по массе) белок плазмы крови, выполняющий в организме важные функции. Альбумин благодаря своим уникальным свойствам сопрягает в организме множество метаболических процессов: поддерживает онкотическое давление плазмы, обеспечивает перенос низкомолекулярных гидрофобных и амфифильных соединений, транспортирует к клеткам тканей жирные кислоты и многие лекарственные соединения; доставляет метаболиты и ксенобиотики к органам-мишеням, в том числе к органам детоксикации. Благодаря наличию в альбуминовой глобуле высокорективного тиола (SH-группы), альбумин является важным участником окислительно-восстановительных процессов в крови. Он является мощным антиоксидантом. Таким образом, изменение конформации связывающих центров альбумина может явиться одним из неизвестных ранее и чрезвычайно важных факторов патогенеза заболеваний [6].

Целью настоящей работы было изучение особенностей конформационных изменений молекулы альбумина сыворотки крови у больных тревожной и меланхолической депрессией.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В первой группе были обследованы 10 пациентов с тревожной депрессией. Состояние больных в соответствии с Международной Классификацией Болезней, 10-е издание, клинические модификации (ICD-10-CM) оценивалось как депрессивный эпизод (F32) или как рекуррентное депрессивное расстройство (F33). Наличие тревоги в рамках депрессии было основным показателем для включения в исследование. Клиническая тяжесть заболевания оценивалась по шкале Гамильтона для депрессии (Hamilton Rating Scale for depression, HAM-D) (21 пункт) и по шкале Гамильтона для тревоги (Hamilton Rating Scale for anxiety, HAM-A) [7]. Контрольная группа в этой части исследования состояла из 10 здоровых добровольцев.

Во второй группе было обследовано 22 пациента (14 женщин и 8 мужчин) с меланхолической депрессией (МД) в соответствии с “The Criteria for Melancholic Features Specifiers, The Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fourth Edition/ Test Revision, (DSM-IV-TR)”. Состояние больных в соответствии с Международной Классификацией Болезней, 10-е издание, клинические модификации (ICD-10-CM) оценивалось как депрессивный эпизод в рамках биполярного депрессивного расстройства (Тип 2) (F32) или структуре рекуррентного депрессивного расстройства (F33). Тяжесть заболевания оценивалась с помощью шкалы Гамильтона для депрессии (HAM-D) (21 пункт). Контрольная группа состояла из 54 добровольцев, которые по клинико-биохимическим параметрам были здоровыми индивидуумами и были демографически и по возрасту сравнимы с больными МД.

Все пациенты на момент госпитализации в клинику аффективных расстройств Московского НИИ психиатрии не получали, по крайней мере в течение 2 недель, никакой антидепрессивной терапии.

Клиническая картина, критерии включения и исключения из исследования описаны ранее [8, 9].

Все больные дали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией о медицинских исследованиях с участием людей и заключением локального этического комитета Московского научно-исследовательского института психиатрии (№ 16 от 13.03.2017 и № 41/2 от 24.04.2023).

Для исследования конформации альбумина был применен метод субнаносекундной лазерной разрешенной во времени флуоресцентной спектроскопии. В качестве флуоресцентного зонда использовался dimethylaminonaphthalic acid N-carboxyphenylimide (CAPIDAN) [10]. Метод проведения исследования конформационных изменений в молекуле альбумина сыворотки крови у больных депрессией подробно описан ранее [11].

Статистический анализ и обработку данных проводили с использованием пакета Statistica, версия 6.0 для Windows. Достоверность различий между группами определяли с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первая группа. При исследовании альбумина сыворотки крови было выявлено различное влияние ионной силы раствора на структуру

альбумина. Мы оценили кривые затухания флуоресценции при трех величинах ионной силы раствора. Лучшие и наиболее стабильные результаты были получены при использовании раствора с ионной силой среды около 0.6 М (KCl) [6]. При проведении флуоресцентной спектроскопии на молекуле альбумина в контроле было выявлено три связывающих центра с амплитудами (A_1 , A_2 и A_3), соответствовавшие трем временам затухания флуоресценции – 9, 3 и 1 нс. В настоящей работе мы представим данные, полученные при исследовании связывающего центра с амплитудой A_1 (9 нс), так как два других связывающих центра (A_2 и A_3) дали приблизительно такие же результаты, как центр A_1 . Значения амплитуды A_1 для контроля и пациентов с тревожной депрессией до начала терапии достоверно различались и равнялись 52.2 ± 1.4 и 42.5 ± 2.2 относительных единиц ($p < 0.02$) соответственно.

Вторая группа. Так же как и в первой группе экспериментов, было выявлено три связывающих центра на молекуле альбумина сыворотки крови здоровых добровольцев (контроль) со временем затухания флуоресценции 9, 3 и 1 нс с амплитудами A_1 , A_2 и A_3 соответственно.

Анализ всех параметров затухания флуоресценции зонда CAPIDAN в альбумине сыворотки крови контролей и больных с МД показал, что до начала антидепрессивной терапии средние значения амплитуд A_1 , A_2 и A_3 в альбумине сыворотки пациентов были достоверно выше, чем в группе контроля. Были установлены достоверные различия между амплитудами для каждого компонента: A_1 – 117 ± 7 и 142 ± 10 ; A_2 – 358 ± 14 и 420 ± 26 ; A_3 – 371 ± 16 и 433 ± 29 относительных единиц, соответственно, для контролей и МД пациентов ($p = 0.025$).

ОБСУЖДЕНИЕ

Использование нанотехнологических подходов, в частности субнаносекундной флуоресцентной спектроскопии, позволяют выявить тонкие изменения в молекуле альбумина. В наших исследованиях с помощью этого приема на молекуле альбумина было выявлено три центра, связывающих специфический флуоресцентный зонд CAPIDAN. Это способствует расширению исследовательских возможностей молекулы альбумина в отличие от метода стационарной флуоресцентной спектроскопии, при котором мы получали суммарную информацию, так называемую эффективную концентрацию альбумина, или резерв связывания альбумина [9].

Были выявлены однонаправленные изменения в молекуле альбумина при тревожной депрессии – снижение величин амплитуд A_1 , A_2 и A_3 у пациентов до начала антидепрессивной терапии. При меланхолической депрессии до начала терапии было

установлено однонаправленное повышение величин амплитуд A_1 , A_2 и A_3 .

Результаты настоящего исследования и данные наших предыдущих работ [6] указывают, что шизофрения и различные типы депрессий сопровождаются различными конформационными нарушениями молекулы альбумина.

Это привело к заключению, что описанный метод может рассматриваться как потенциально полезный для объективной оценки эффективности фармакотерапии, тогда как изученные параметры могут служить в качестве потенциального биомаркера.

Что может быть причиной нарушения конформации белков, и в частности альбумина? Изменения конформационной стабильности [5] альбумина может быть результатом его посттрансляционной модификации. Но это должно повлечь за собой нарушение первичной структуры белка, т.е. его аминокислотной последовательности. Однако это вряд ли происходит. Как было установлено нами, у больных первого эпизода шизофрении после проведенной терапии конформационное состояние альбумина восстанавливалось, что мы считаем, не могло бы произойти при нарушенной первичной структуре.

Нарушение конформационной устойчивости белков (альбумина) может быть следствием патологического изменения параметров внутренней среды организма [5], а также окислительного стресса и процессов нейровоспаления, сопровождающих депрессию [12].

Основным последствием изменения конформационной стабильности альбумина при депрессии может быть нарушение его функций, о которых мы указывали выше. В подтверждение этого тезиса мы можем привести наши данные по изучению влияния конформационных изменений альбумина на его антиоксидантные свойства при первом эпизоде шизофрении [13]. Известно, что выполнение альбумином антиоксидантной функции зависит не только от его восстановленных тиоловых (SH) групп, но и от конформационного состояния молекулы альбумина [10]. У больных с первым эпизодом шизофрении еще до начала лечения была достоверно, на 25% ($p < 0,05$), снижена реакционная способность SH-групп альбумина, т.е. снижена его антиоксидантная активность [13]. Таким образом, это исследование подтвердило, что изменение конформации молекулы альбумина нарушает его нормальное функционирование.

Однако механизм разнонаправленного изменения конформационных свойств молекулы альбумина сыворотки крови при тревожной и меланхолической депрессии остается непонятным. Мы полагаем, что определенный вклад в эти патологические процессы вносит эндогенная интоксикация

[14]. Нельзя исключить, что это также связано с какими-то неизвестными этиологическими факторами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований указывают, что тревожная и меланхолическая депрессия сопровождаются конформационными изменениями молекулы альбумина, что может повреждать его функциональные свойства. Изученные параметры могут служить в качестве потенциальных биомаркеров для оценки эффективности психофармакотерапии.

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 от 13.03.2017 и № 41/2 от 24.04.2023).

Информированное согласие. Все больные и здоровые добровольцы дали информированное согласие на участие в исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Goodwin F.K., Jamison K.R. Maniac Depressive Illness: Bipolar Disorders and Recurrent Depression. N.Y.: Oxford University Press, 2007. 159 p.
2. World Health Assembly. Global Burden of Mental Disorders and the Need for a Comprehensive, Coordinated Response from Health and Social Sectors at the Country Level // Report by the Secretariat World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2012.
3. Spinney L. // Eur. Psychiatry. 2009. V. 24. P. 550–551.
4. Краснов В.Н. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2012. Т. 112. Вып. 2. Депрессия. С. 3–11.
5. Сахаров В.Н., Лутвицкий П.Ф. // Вестник РАМН. 2016. Т. 71. № 1. С. 46–51.
6. Dobretsov G.E., Syreishchikova T.I., Smolina N.V., and Uzbekov M.G. // Human Serum Albumin, Ed. Stokes T.N.Y: Nova Science Publishers. 2015. P. 129–171.
7. Hamilton M. Handbook of Anxiety Disorders / Eds. Last C., Hersen M. Oxford: Pergamon Press. 1988. P. 143–155.
8. Сырейщикова Т.И., Смолина Н.В., Узбекиков М.Г., Добрецов Г.Е., Калинина В.В., Крюков В.В., Антипова О.С., Емельянова И.Н., Краснов В.Н. // Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. 2015. Т. 115. № 1. Вып. 2. С. 56–59.
9. Uzbekov M., Misionzhnik E., Maximova N., Vertogradova O. // Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental. 2006. V. 21. P. 109–115.
10. Gryzunov Yu.A., Dobretsov G.E. Protein Conformation: New Research / Ed. Roswell L.B. N. Y.: Nova Publ., 2008. P. 125–159.
11. Узбекиков М.Г., Смолина Н.В., Сырейщикова Т.И., Бриллиантова В.В., Добрецов Г.Е., Шихов С.Н. // Нейрохимия. 2022. Т. 39. № 4. С. 78–84.
12. Узбекиков М.Г. // Социальная и клиническая психиатрия. 2022. Т. 32. № 3. С. 83–87.
13. Бриллиантова В.В., Смолина Н.В., Сырейщикова Т.И., Узбекиков М.Г., Добрецов Г.Е. // Нейрохимия. 2018. Т. 35. № 1. С. 96–100.
14. Узбекиков М.Г. // Биохимия. 2023, Т. 88. Вып. 4. С. 600–613.

Anxious and Melancholic Depression are Followed by Differently Directed Serum Albumin Conformation

M. G. Uzbekov¹, N. V. Smolina¹, T. I. Syreishchikova¹, N. M. Maximova¹, S. N. Shikhov¹,
G. E. Dobretsov¹, V. V. Brilliantova¹, and V. V. Krjukov¹

¹Moscow Research Institute of Psychiatry, Moscow, Russia

The aim of the study was investigation of the peculiarities of the conformational changes of serum albumin in patients with anxious and melancholic depression. Albumin conformation was measured by the method

of the subnanosecond laser time resolved fluorescence spectroscopy. Anxious depression was followed with the significant decrease of the values of the three amplitudes on the serum albumin in comparison with controls. In the melancholic depression the values of all three amplitudes on serum albumin molecules were significantly elevated in comparison with controls. These results are clearly indicated that anxious and melancholic depression are followed by differently directed changes in serum albumin conformation.

Keywords: anxious depression, melancholic depression, serum albumin, subnanosecond laser fluorescent spectroscopy, binding sites, amplitudes

МАРКЕРЫ ВОСПАЛЕНИЯ, ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО И ГЛУТАМАТНОГО МЕТАБОЛИЗМА, АНТИОКСИДАНТНОЙ ЗАЩИТЫ У ПАЦИЕНТОВ С ЮНОШЕСКИМИ ДЕПРЕССИЯМИ

© 2024 г. С. А. Зозуля¹, *, О. К. Савушкина¹, Т. А. Прохорова¹, Е. Б. Терешкина¹, И. С. Бокша¹,
М. А. Омельченко¹, Т. П. Ключник¹

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

*E-mail: s.ermakova@mail.ru

Поступила в редакцию 05.06.2023 г.

После доработки 06.06.2023 г.

Принята к публикации 07.06.2023 г.

Вовлеченность процессов воспаления, нарушений метаболизма глутамата и окислительного стресса в патогенез шизофрении и аффективных расстройств доказана многочисленными исследованиями. Представляется актуальной оценка роли этих систем в развитии ранних до- манифестных стадий шизофрении у пациентов юношеского возраста с депрессиями. Целью данного исследования было изучение связи маркеров воспаления, энергетического и глутаматного метаболизма, а также антиоксидантной защиты с клиническими особенностями пациентов с юношескими депрессиями. Обследовано 74 юноши в возрасте 16–25 лет с первым депрессивным эпизодом (F32.1–2, F32.38, F32.8), из них 32 человека с преобладанием аттенуированных позитивных симптомов, 22 человека с преобладанием аттенуированных негативных симптомов и 20 человек без аттенуированных симптомов шизофрении. Контрольная группа включала 57 психически здоровых молодых людей в возрасте 16–25 лет. Определяли ферментативную активность лейкоцитарной эластазы, функциональную активность $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора, уровень аутоантител к белку S100B и основному белку миелина в плазме крови и ферментативную активность цитохром *c*-оксидазы, глутаматдегидрогеназы, глутатионредуктазы и глутатион-S-трансферазы в тромбоцитах. В рамках каждой клинической группы выявлены различия в профилях иммунологических и биохимических показателей. Разделение пациентов на кластеры по всем исследуемым биологическим показателям показало разный уровень воспаления и снижения показателей метаболизма глутамата и антиоксидантной защиты по сравнению с контролем, связанный с особенностями психопатологической симптоматики пациентов. Полученные результаты подтверждают взаимосвязь изученных метаболических систем и их различный вклад в развитие юношеских депрессий с разной психопатологической структурой, что важно для оценки роли этих систем в траектории развития заболевания и своевременной терапевтической коррекции.

Ключевые слова: юношеские депрессии, аттенуированные симптомы шизофрении, биомаркеры, нейровоспаление, метаболизм глутамата, окислительный стресс

DOI: 10.31857/S1027813324010031, EDN: GZFFVF

Список сокращений:

HDRS-21 – шкала Гамильтона для оценки депрессии

NMDAR – рецептор N-метил-D-аспартата

SOPS – шкала продромальных симптомов

aAT – аутоантитела

АНС – аттенуированные негативные симптомы

АПС – аттенуированные позитивные симптомы

АСШ – аттенуированные симптомы шизофрении

АФК – активные формы кислорода

ГДГ – глутаматдегидрогеназа

ГР – глутатионредуктаза

ГТ – глутатион-S-трансфераза

ЛЭ – лейкоцитарная эластаза

$\alpha 1$ -ПИ – $\alpha 1$ -протеиназный ингибитор

ОБМ – основной белок миелина

ЦО – цитохром *c*-оксидаза

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленные исследования свидетельствуют, что нейровоспаление является ключевым механизмом психических заболеваний, включая шизофрению и аффективные расстройства [1, 2]. Процесс нейровоспаления связан с активацией микроглии и сопровождается ее морфологическими и функциональными изменениями. Активированная микроглия синтезирует повышенный уровень провоспалительных цитокинов, вызывающих нейротрансмиттерный дисбаланс, а также различные цитотоксические факторы, способствующие нейродегенеративным процессам [3, 4].

Активация воспаления в мозге сопровождается повышением в крови пациентов уровня провоспалительных факторов, острофазных белков, активных форм кислорода (АФК) и азота, протеаз, молекул клеточной адгезии и других факторов, а в ряде случаев — появлением аутоантител к антигенам мозга [5–7]. Выявлены также корреляции ряда периферических маркеров воспаления с особенностями психопатологической симптоматики пациентов [8, 9]. Нейроиммунные взаимосвязи в норме и при патологических состояниях осуществляются преимущественно посредством цитокинов.

Результаты собственных исследований свидетельствуют, что уровень активации иммунной системы (воспаления), оцененный по совокупности иммунологических показателей плазмы крови — активности протеазы нейтрофилов лейкоцитарной эластазы (ЛЭ), активности острофазного белка $\alpha 1$ -протеиназного ингибитора ($\alpha 1$ -ПИ) и уровню аутоиммунных реакций к астроцитарному белку S100B и основному белку миелина (ОБМ) отражает активность текущего патологического процесса в мозге, коррелируя с тяжестью состояния пациентов [10, 11].

Показано, что нейровоспаление ассоциировано с глутаматергической дисфункцией и окислительным стрессом [12]. Вовлечение глутаматной системы в патологический процесс при психических заболеваниях связано с гиподисфункцией глутаматных NMDA-рецепторов (NMDAR), расположенных на ингибирующих ГАМК-интернейронах, что приводит к усилению глутаматергической нейротрансмиссии и различным симптомам, возникающим при остром психозе [13]. Нарушения в глутаматергической системе и метаболизме глутамата поддерживаются исследованиями мозга [14–16] и крови пациентов с психозами и аффективными расстройствами [17, 18], а также данными доклинических исследований об антидепрессивном действии антагонистов глутаматных рецепторов [19].

Предполагается, что глутаматергическая гиподисфункция, опосредованная в основном блокадой NMDAR, ассоциирована с дофаминергической

дисфункцией при шизофрении. Повышенный уровень кинуреновой кислоты, эндогенного антагониста NMDAR, возникающий в результате нарушения метаболизма триптофана/кинуренина, может вызывать психотические симптомы и ухудшение когнитивных функций пациентов [20].

Недавние исследования показали, что провоспалительные цитокины в ЦНС регулируют концентрацию внеклеточного глутамата как при физиологических, так и при патологических состояниях. Связывание цитокинов с рецепторами микроглии и астроцитов индуцирует окислительный стресс и нарушение клиренса глутамата [21, 22].

Глутамат является универсальной сигнальной молекулой. Рецепторы и транспортеры глутамата присутствуют не только в ЦНС, но и в периферических органах, в том числе и в клетках крови. Связывание глутамата с периферическими иммунными клетками и тромбоцитами играет важную роль в патогенезе заболеваний, ассоциированных с воспалением [23]. Показано, что при расстройствах шизофренического спектра и депрессии повышается концентрация глутамата в сыворотке крови больных [17]. Кроме того, глутамат необходим для синтеза белков и является важным участником энергетического метаболизма.

Ключевым ферментом метаболизма глутамата является глутаматдегидрогеназа (ГДГ), катализирующая окислительное дезаминирование глутамата с образованием альфа-кетоглутарата, который служит промежуточным метаболитом цикла трикарбоновых кислот. Кроме участия в энергетическом обмене, ГДГ также участвует в поддержании окислительно-восстановительного баланса в клетках и внутриклеточной передаче сигналов. Ранее собственными исследованиями было обнаружено снижение активности ГДГ в тромбоцитах больных шизофренией при обострении психотической симптоматики [19] и больных депрессией пожилого возраста [24].

Активация воспаления тесно связана с окислительным стрессом, приводящим к формированию провоспалительного и прооксидативного статуса. Повышенная выработка АФК или снижение антиоксидантной защиты способствуют развитию окислительного стресса и повреждению мембранных фосфолипидов, ДНК и белков, что, в свою очередь, может привести к нарушению передачи сигналов и снижению пластичности [25, 26].

Данные биохимических и нейрофизиологических исследований свидетельствуют о том, что гиподисфункция NMDAR, нарушение метаболизма глутамата и окислительный стресс взаимосвязаны и способствуют развитию шизофрении и аффективных расстройств [27, 28].

Уровень окислительного стресса у пациентов с шизофренией и аффективными расстройствами

оценивается по активности антиоксидантных ферментов системы глутатиона — глутатион-S-трансферазы (ГТ) и глутатионредуктазы (ГР) в клетках крови и связан с психопатологической симптоматикой [29, 30].

Особую важность приобретает вопрос изучения состояния вышеперечисленных систем в развитии ранних доманифестных стадий шизофрении у пациентов юношеского возраста с депрессиями с различной психопатологической структурой, что важно для оценки роли этих систем в траектории развития заболевания и своевременной терапевтической коррекции.

Целью данного исследования было изучение связи маркеров воспаления, энергетического и глутаматного метаболизма, а также антиоксидантной защиты с клиническими особенностями пациентов с юношескими депрессиями, в первую очередь, с депрессиями с аттенуированными симптомами шизофрении, составляющими группу высокого риска манифестации психоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наблюдательное исследование “случай — контроль” проведено на базе лаборатории нейроиммунологии и лаборатории нейрохимии совместно с отделом юношеской психиатрии ФГБНУ НЦПЗ.

Проведение исследования одобрено Этическим комитетом ФГБНУ НЦПЗ (Протокол № 8 от 26.02.2019) и выполнено с соблюдением современных этических норм и правил биомедицинских исследований, утвержденных Хельсинкским соглашением Всемирной медицинской ассоциации (в ред. 1975/2000 гг.).

Обследовано 74 пациента в возрасте 16–25 лет (медиана 19.0 лет, [18.0; 21.0]), госпитализированных в клинику с первым депрессивным эпизодом (F32.1, F32.2, F32.38, F32.8 по МКБ-10). Все пациенты были обследованы до начала терапии.

У 54 больных в структуре депрессивного состояния присутствовали аттенуированные (ослабленные) симптомы шизофрении (АСШ). “Подпороговая” степень выраженности симптомов делала их доступными для выявления, но не позволяла диагностировать в рамках расстройств шизофренического спектра.

На основании наличия в структуре депрессивного состояния ослабленных симптомов шизофрении, которые включают психопатологические феномены из спектра позитивных и негативных расстройств, все пациенты с депрессией и АСШ были разделены на две группы: 1-я группа — депрессия с аттенуированными позитивными симптомами (АПС, $n = 32$) и 2-я группа — депрессия с аттенуированными негативными симптомами (АНС, $n = 22$). Аттенуированные позитивные симптомы

клинически проявлялись в нестойких, кратковременных бредовых идеях, зрительных и слуховых иллюзиях, элементах истинных галлюцинаторных и псевдогаллюцинаторных переживаний, идеаторных, сенестопатических и кинестетических автоматизмах. Аттенуированные негативные симптомы были представлены отдельными явлениями социальной изоляции и социального избегания, истощаемости энергетического потенциала, снижением продуктивности волевой деятельности с признаками эмоционального обеднения, которые имеют тенденцию к усилению в структуре развившегося депрессивного эпизода и становятся доступными для клинической верификации.

Остальные пациенты (20 человек) составили 3-ю группу, которая характеризовалась наличием депрессивного эпизода без АСШ и обладала схожими социально-демографическими, возрастными и нозологическими характеристиками.

Группа контроля включала 57 психически и соматически здоровых юношей в возрасте 16–25 лет.

Оценку тяжести депрессивных симптомов проводили с помощью шкалы Гамильтона (HDRS-21). Для оценки тяжести аттенуированных психотических симптомов использовалась шкала продромальных симптомов (SOPS), представляющая собой часть структурированного интервью для продромальных симптомов (SIPS) [31] и включающая подшкалы позитивных (SOPS-P) и негативных симптомов (SOPS-N), симптомов дезорганизации (SOPS-D) и общих психопатологических симптомов (SOPS-G).

Критериями включения пациентов в исследование являлись: юношеский возраст (16–25 лет), впервые развившееся депрессивное состояние и добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

К критериям исключения относились: наличие анамнестических данных о нарушениях психического развития, выраженные психотические симптомы, сопутствующая психическая патология, клинически значимые хронические соматические и неврологические заболевания, наличие инфекционных, воспалительных и аутоиммунных заболеваний в течение двух месяцев до начала обследования.

В плазме крови пациентов и здоровых добровольцев определяли активность маркеров воспаления лейкоцитарной эластазы (ЛЭ), α 1-ПИ, а также уровень аАТ к S100B и ОБМ [32]. В тромбоцитах определяли активность фермента энергетического метаболизма цитохром *c*-оксидазы (ЦО), фермента глутаматного метаболизма (ГДГ) и активности ферментов антиоксидантной защиты (ГР и ГТ).

Активность маркеров воспаления определялась с помощью кинетических методов с использованием

спектрофотометра Ultrospec 5300 (Amersham, США). Ферментативная активность ЛЭ оценивалась по скорости гидролиза субстрата N-t-BOC-Ala-p-NP, предварительно растворенного в ацетонитриле (Sigma, США). Активность оценивали по нарастанию поглощения, регистрируемому при 347 нм. Функциональную активность α 1-ПИ определяли по степени торможения ВАЕЕ-эстеразной активности трипсина (Sigma, США). Смесь предварительно инкубировали в течение 3 мин. Концентрацию образующегося продукта измеряли при 253 нм.

Количественное определение уровня аАТ к белкам S100B и ОБМ проводили методом стандартного твердофазного иммуноферментного анализа. Оптическую плотность регистрировали при 492 нм на планшетном спектрофотометре ИФА-анализаторе Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США). В качестве антигенов использованы белки S100B и ОБМ из головного мозга быка (Sigma, США), в качестве конъюгата – антитела кролика к IgG и IgM с пероксидазой хрена (ООО “ИМТЕК”, Россия).

Активность ферментов определялась спектрофотометрическими кинетическими методами с использованием планшетного спектрофотометра xMark (Bio-Rad, США). Удельная активность ЦО определялась по скорости ферментативного окисления кислородом воздуха химически восстановленного ферроцитохрома *c* до феррицитохрома *c* посредством мониторинга кинетики снижения поглощения реакционной среды при 550 нм [29]. Активность ГДГ определялась по убыли поглощения НАД \cdot Н, регистрируемого при 340 нм [18]. Активность ГР определялась по окислению НАДФ \cdot Н (по убыли поглощения, регистрируемого при 340 нм) в реакции восстановления окисленного глутатиона [30]. Активность ГТ определялась по скорости образования хромогенных конъюгатов глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом (нарастанию поглощения, регистрируемого при 340 нм) [30]. После определения концентрации белка по методу Лоури для всех ферментов рассчитывали удельную активность.

Для статистической обработки данных использовали программное обеспечение Statistica 8.0. Поскольку при проверке нормальности распределения показателей по критерию Шапиро – Уилка выборка не соответствовала закону нормального распределения, полученные данные анализировались с помощью непараметрических статистических методов анализа (критерий Краскела – Уоллиса, критерий Манна – Уитни, корреляционный анализ с расчетом коэффициента ранговых корреляций Спирмена). Результаты представлены в виде медианы (*Me*), нижнего (*Q*25) и верхнего (*Q*75) квартилей. Для разделения исследуемой совокупности на кластеры, схожие

или различающиеся между собой по изучаемым иммунологическим и биохимическим показателям, использовался кластерный анализ с предварительным нормированием переменных по максимуму. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Иммунологические и биохимические показатели в обследованных группах пациентов с юношескими депрессиями. Психометрическая оценка пациентов по шкале HDRS-21 показала, что степень тяжести депрессии во всех клинических группах была схожей (26 [23; 31.5], 26.5 [21; 32], 26 [21.5; 28.5] баллов в группе с АПС, группе с АНС и группе без АСШ соответственно).

В табл. 1 представлены результаты определения показателей воспаления, энергетического и глутаматного метаболизма, а также антиоксидантной защиты в выделенных группах пациентов и их сопоставление с контрольной группой.

Во всех клинических группах пациентов наблюдалось статистически значимое повышение активности ЛЭ и α 1-ПИ ($p < 0.0001$), а также снижение активности ГДГ, ГР и ГТ ($p < 0.001$) по сравнению с контрольной группой. Статистически значимых изменений относительно контроля уровня аАТ к S100B и ОБМ, а также активности ЦО выявлено не было.

Таким образом, юношеские депрессии (как с АСШ, так и без таковых) сопровождаются активацией воспалительных реакций и снижением активности метаболических систем, связанных с метаболизмом глутамата и глутатиона.

При сравнении выделенных клинических групп по исследуемым биологическим показателям, проведенным методом Краскела–Уоллиса, оказалось, что значимые различия выявлены только по активности тромбоцитарных ферментов ГДГ, ГР и ГТ ($p < 0.001$). Поиск внутригрупповых различий методом Манна–Уитни выявил, что более выраженное снижение активности этих ферментов было характерно для пациентов с юношескими депрессиями, ассоциированными с аттенуированными симптомами шизофрении (как АПС, так и АНС), по сравнению с больными без АСШ. Следует отметить также, что самые низкие значения активности ГДГ и ГР отмечались в группе больных с депрессиями с АНС. Остальные биологические показатели у пациентов выделенных клинических групп значимо не различались.

Таким образом, депрессии с АСШ характеризуются более выраженными изменениями активности ферментов глутаматного метаболизма и антиоксидантной защиты по сравнению с депрессией без аттенуированных симптомов шизофрении.

Таблица 1. Показатели воспаления, энергетического, глутаматного метаболизма и антиоксидантной защиты в группах пациентов с юношескими депрессиями (с АПС и без них) и контрольной группе, *Me* [25–75%]

Показатель	Пациент			Контрольная группа, <i>n</i> = 57
	Депрессии с АПС, <i>n</i> = 32	Депрессии с АНС, <i>n</i> = 22	Депрессии без АСШ, <i>n</i> = 20	
Лейкоцитарная эластаза, нмоль/мин × мл	239.1* [211.1; 254.8]	245.7* [222.5; 265.7]	239.2* [222.8; 262.9]	195.2 [184.6; 211.6]
α1-протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	47.0* [38.0; 52.0]	44.7* [36.6; 52.4]	45.7* [36.7; 49.3]	34.6 [30.5; 37.9]
аАТ к S100В, ед. опт. пл.	0.68 [0.61; 0.78]	0.69 [0.65; 0.79]	0.75 [0.69; 0.81]	0.71 [0.60; 0.78]
аАТ к ОБМ, ед. опт. пл.	0.66 [0.60; 0.80]	0.71 [0.65; 0.86]	0.74 [0.63; 0.90]	0.75 [0.60; 0.82]
Цитохром <i>c</i> -оксидаза, Ед/мг	6.2 [5.6; 7.2]	6.0 [5.0; 7.1]	6.9 [5.5; 10.3]	6.2 [5.2; 7.9]
Глутаматдегидрогеназа, Ед/мг	5.6* [4.8; 6.9]	4.7* [3.9; 6.5]	6.1* [5.2; 6.8]	7.2 [6.1; 7.9]
Глутатионредуктаза, Ед/мг	8.6* [6.8; 9.5]	6.9* [6.1; 7.9]	8.8* [7.1; 9.7]	11.4 [9.9; 13.4]
Глутатион-S-трансфераза, Ед/мг	11.1* [9.7; 13.3]	11.3* [10.0; 14.9]	13.3* [12.0; 15.9]	18.8 [17.2; 25.0]

* Сравнение с контролем, *p* < 0.001.

Активация воспалительных маркеров, сопровождаемая наименьшими изменениями показателей глутаматного метаболизма и антиоксидантной защиты, характерна для пациентов с депрессиями с преобладанием АПС. Большее снижение биохимических показателей характерно для пациентов с депрессиями и преобладанием АНС. Депрессии без АСШ характеризуются умеренными изменениями изучаемых показателей.

Клинико-биологические корреляции в различных клинических группах пациентов с юношескими депрессиями. Корреляционный анализ выявил наличие ряда значимых клинико-биологических взаимосвязей между оценкой клинического состояния пациентов с юношескими депрессиями по шкалам HDRS-21 и SOPS и анализируемыми биологическими показателями.

В группе с депрессией и АПС тяжесть депрессивной симптоматики положительно коррелировала с активностью ЛЭ (*R* = 0.37, *p* < 0.05). Выявлены положительные корреляции между некоторыми биохимическими показателями и балльной оценкой по подсшкалам SOPS. Интересно, что в группе с АПС наблюдалась связь между активностью ЦО и суммой баллов по подсшкале негативных симптомов SOPS-N (*R* = 0.42, *p* < 0.05), а в группе АНС – корреляция между активностью ГДГ и суммой баллов по подсшкале позитивных симптомов SOPS-P (*R* = 0.47, *p* < 0.05).

Таким образом, чем выше активность ЛЭ, тем больше тяжесть выявляемых у пациентов депрессивных симптомов (по HDRS-21). Нарастание активности ЦО сопровождается усилением выраженности аттенуированной негативной симптоматики, а увеличение активности ГДГ – аттенуированной позитивной симптоматики по SOPS.

Помимо клинико-биологических взаимосвязей, значимые положительные корреляции обнаружены также между биологическими показателями. У пациентов с АПС выявлена прямая связь между активностью α1-ПИ и активностью ГДГ (*R* = 0.472, *p* < 0.05), а также прямая корреляция между активностью ЛЭ и активностью ГТ (*R* = 0.387, *p* < 0.05). Корреляция ферментативной активности ГДГ с активностью ГТ выявлена в общей группе больных, а также у пациентов с депрессией и АНС и в группе с депрессией без АСШ (*R* = 0.34, *p* < 0.05, *R* = 0.49, *p* < 0.05 и *R* = 0.49, *p* < 0.05 соответственно). Во всех клинических группах пациентов обнаружена высокозначимая корреляционная связь между уровнем аАТ к S100В и ОБМ (*R* = 0.707, *p* < 0.001).

Выявленные корреляционные связи свидетельствуют о вовлеченности воспалительных и аутоиммунных реакций в развитие как депрессивных симптомов, так и аттенуированных психотических симптомов у пациентов на ранних стадиях заболевания. Повышение уровня воспаления у этих пациентов сопряжено с изменением глутаматного

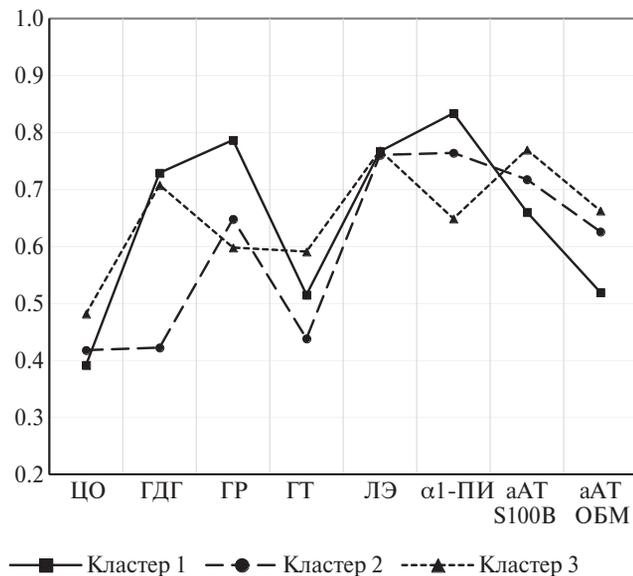


Рис. 1. Кластеры иммунологических и биохимических показателей у пациентов с юношескими депрессиями.

метаболизма и со снижением уровня активности ферментов антиоксидантной защиты и коррелирует с тяжестью депрессивной и аттенуированной психотической симптоматики.

Кластерный анализ иммунологических и биохимических показателей у пациентов с депрессией. При анализе общей выборки больных по каждому из изучаемых биологических показателей было обнаружено, что, с одной стороны, исследуемая группа была достаточно однородна как по иммунологическим, так и биохимическим параметрам (медианы значений), а с другой стороны, для каждого показателя была характерна значительная вариабельность, характеризующая разную степень отклонений от нормы отдельных патогенетических звеньев. Для некоторых из показателей, в частности, ЛЭ и $\alpha 1$ -ПИ, разброс значений был максимальным, что наблюдалось главным образом у пациентов с депрессией и АСШ.

Для решения поставленной задачи в работе был использован кластерный анализ с предварительным нормированием по максимуму значений иммунологических (ЛЭ, $\alpha 1$ -ПИ, аАТ к S100В и ОБМ) и биохимических (ЦО, ГДГ, ГР, ГТ в тромбоцитах) показателей. Заданное число кластеров составило 3, число итераций было равно 2 [33]. Графическое изображение кластеров (Кластер 1 ($n = 21$), Кластер 2 ($n = 30$), Кластер 3 ($n = 23$)) представлено на рис. 1, а их характеристики – в табл. 2.

По сравнению с контролем выделенные кластеры характеризовались преимущественно повышением в крови активности маркеров воспаления ЛЭ ($p < 0.01$) и $\alpha 1$ -ПИ ($p < 0.01$) и снижением

в тромбоцитах всех изучаемых биохимических показателей ($p < 0.05$), за исключением ЦО.

Методом Краскела–Уоллиса обнаружены достоверные различия между кластерами по активности $\alpha 1$ -ПИ ($p < 0.001$), уровню аАТ к S100В и ОБМ ($p < 0.05$ и $p < 0.001$ соответственно), а также по показателям активности ГДГ ($p < 0.0001$), ГР ($p < 0.05$) и ГТ ($p < 0.001$).

Кластер 1 характеризуется наиболее высокой активностью $\alpha 1$ -ПИ и наиболее низким уровнем аАТ к S100В и ОБМ по сравнению с кластерами 2 и 3. Этот кластер характеризуется также наименьшим снижением ферментативной активности ГДГ и ГР по сравнению с другими кластерами.

Кластер 2 характеризуется самыми низкими значениями показателей активности ГДГ, ГР и ГТ.

Кластер 3 характеризуется не отличающейся от контроля функциональной активностью $\alpha 1$ -ПИ. По активности ферментов глутаматного метаболизма (ГДГ) и антиоксидантной защиты (ГР) этот кластер занимает промежуточное положение между кластерами 1 и 2. Этот кластер характеризуется также наиболее высокой активностью ГТ по сравнению с кластерами 1 и 2.

Таким образом, можно заключить, что выделенные биологические кластеры характеризуются разным уровнем воспаления, снижающимся от кластера 1 к кластеру 3, и разной степенью снижения уровня активности ферментов глутаматного метаболизма и антиоксидантной защиты.

Оценка клинических проявлений у пациентов, попавших в разные кластеры, не выявила различий по тяжести депрессии (26 [24; 30], 25 [20; 30] и 28 [21; 33] баллов по HDRS-21 в кластерах 1, 2 и 3 соответственно), но продемонстрировала разную выраженность аттенуированных позитивных симптомов (11 [10; 12], 7.5 [5; 11] и 9 [4; 12] у пациентов кластеров 1, 2 и 3 соответственно), которые преобладали у пациентов кластера 1 ($p < 0.05$, метод Краскела – Уоллиса).

Клинико-биологические корреляции в выделенных кластерах. В кластере 1 клинико-биологических взаимосвязей обнаружено не было. В кластере 2 суммарная балльная оценка тяжести депрессии по шкале HDRS-21 положительно коррелировала с активностью ЛЭ ($R = 0.48$, $p < 0.05$). В кластере 3 выявлены отрицательные корреляции между выраженностью аттенуированных симптомов дезорганизации SOPS-D и суммарным баллом SOPS и активностью $\alpha 1$ -ПИ ($R = -0.52$, $p < 0.05$ и $R = -0.46$, $p < 0.05$), а также активностью ГДГ и суммарным баллом SOPS ($R = -0.46$, $p < 0.05$).

Также в кластерах были обнаружены различные корреляции между биологическими показателями. В кластере 1 обнаружены значимые отрицательные связи между активностью ЦО и аАТ к S100В

Таблица 2. Иммунологические и биохимические параметры у пациентов с юношескими депрессиями, входящих в разные кластеры, *Me* [25–75%]

Показатель	Пациент			<i>p</i>
	Кластер 1, <i>n</i> = 21	Кластер 2, <i>n</i> = 30	Кластер 3, <i>n</i> = 23	
Лейкоцитарная эластаза, нмоль/мин × мл	246.2 [224.6; 261.4]	239.6 [209.5; 265.7]	236.8 [226.8; 259.2]	—
α1-протеиназный ингибитор, ИЕ/мл	51.5 [46.5; 53.6]	48.2 [38.0; 52.2]	38.0 [34.8; 42.6]	$p^{2-3} < 0.01$ $p^{1-3} < 0.0001$
аАТ к S100В, ед. опт. пл.	0.64 [0.59; 0.69]	0.72 [0.64; 0.78]	0.78 [0.69; 0.83]	$p^{1-2} < 0.05$ $p^{1-3} < 0.01$
аАТ к ОБМ, ед. опт. пл.	0.62 [0.58; 0.66]	0.75 [0.64; 0.87]	0.80 [0.66; 0.90]	$p^{1-2} < 0.001$ $p^{1-3} < 0.001$
Цитохром <i>c</i> -оксидаза, Ед/мг	6.11 [5.52; 7.18]	5.69 [3.99; 7.42]	6.80 [5.97; 10.40]	—
Глутаматдегидрогеназа, Ед/мг	6.97 [5.96; 7.49]	4.00 [3.27; 4.64]	6.41 [5.80; 7.17]	$p^{1-2} < 0.0001$ $p^{2-3} < 0.0001$
Глутатионредуктаза, Ед/мг	9.01 [7.92; 9.92]	7.23 [5.71; 9.46]	7.71 [5.57; 9.16]	$p^{1-2} < 0.01$ $p^{1-3} < 0.01$
Глутатион-S-трансфераза, Ед/мг	11.44 [9.67; 13.94]	10.43 [9.62; 12.74]	14.96 [12.62; 17.40]	$p^{2-3} < 0.0001$ $p^{1-3} < 0.05$

($R = -0.57, p < 0.05$) и аАТ к ОБМ ($R = -0.48, p < 0.05$), а также отрицательные корреляции между активностью ЛЭ и аАТ к S100В ($R = -0.68, p < 0.05$) и аАТ к ОБМ ($R = -0.56, p < 0.05$).

В кластере 2 функциональная активность α1-ПИ положительно коррелировала с активностью ГДГ ($R = 0.4, p < 0.05$), а активность ГР – с уровнем аАТ к S100В ($R = 0.39, p < 0.05$) и ОБМ ($R = 0.4, p < 0.05$).

В кластере 3 активность α1-ПИ положительно коррелировала с активностью ГДГ ($R = 0.42, p < 0.05$), а активность ГТ отрицательно коррелировала с уровнем антител к S100В ($R = -0.53, p < 0.05$).

Далее было проведено распределение пациентов клинических групп по выделенным кластерам. За 100% принималось количество пациентов в соответствующей клинической группе. Показано, что в каждом кластере доля пациентов разных клинических групп оказалась различной (табл. 3).

Различия между кластерами были статистически значимы. Значение критерия χ^2 составило 19.996 при уровне значимости $p < 0.001$. Связь между отдельными кластерами составила: для кластеров 1 и 2 – $\chi^2 = 24.40, p < 0.0001$; с поправкой Йетса $\chi^2 = 22.71, p < 0.0001$; для кластеров 1 и 3 $\chi^2 = 21.56, p < 0.0001$, с поправкой Йетса $\chi^2 = 19.94, p < 0.0001$.

В рамках каждой клинической группы встречаются пациенты с различными профилями иммунологических и биохимических маркеров. Следует отметить, что большинство пациентов с депрессией с АПС входят в кластер 1, характеризующийся

максимальным уровнем воспаления и наименьшим изменением активности ферментов глутаматного метаболизма и антиоксидантной защиты. Большинство пациентов с депрессией и АНС составляют кластер 2, который отличается наибольшим снижением всех биохимических показателей по сравнению с контролем. Наименьший уровень воспаления и изменений активностей тромбоцитарных ферментов характерен для кластера 3, который составляют преимущественно пациенты с депрессией без аттенуированных психотических расстройств.

Таким образом, результаты проведенного исследования подтверждают вовлеченность воспаления, нарушений глутаматного и энергетического метаболизма и окислительного стресса в развитие юношеских депрессий с различными психопатологическими особенностями, а также подтверждают взаимосвязь этих систем при развитии изучаемых психопатологических состояний.

Выявлены различия в профилях иммунологических и биохимических показателей и клинико-биологические корреляции у пациентов выделенных клинических групп с депрессией, которые связаны с метаболически воспалительным дисбалансом разной степени выраженности. Наиболее яркие отличия характерны для пациентов с депрессией, ассоциированной с аттенуированными симптомами шизофрении.

Интересным является также результат о том, что пациенты каждой клинической группы входят

Таблица 3. Распределение пациентов с юношескими депрессиями по биологическим кластерам

Группа (<i>n</i> = 74)	Кластер		
	1-й (<i>n</i> = 21)	2-й (<i>n</i> = 30)	3-й (<i>n</i> = 23)
Депрессия с АПС (<i>n</i> = 32, 43.2%)	16 пациентов 50%	11 пациентов 34.4%	5 пациентов 15.6%
Депрессия с АНС (<i>n</i> = 22, 29.7%)	3 пациента 13,6%	13 пациентов 59.1%	6 пациентов 27.3%
Депрессии без АСШ (<i>n</i> = 20, 27.1%)	2 пациента 10%	6 пациентов 30%	12 пациентов 60%

в каждый из выделенных кластеров, т.е. схожее фенотипическое проявление заболевания может быть обусловлено различной биологической основой, связанной с различной вовлеченностью в патологический процесс тех или иных метаболических систем.

Стратификация пациентов не только по особенностям клинических проявлений, но также с учетом индивидуальных биологических показателей является важнейшим направлением персонализированной медицины. Такой подход способствует не только раннему выявлению нарушений в метаболических системах, но также повышению эффективности терапии.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют, что биохимические и иммунологические маркеры могут использоваться для диагностики риска развития шизофрении у пациентов юношеского возраста с депрессией в качестве дополнительного объективного инструмента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование подтверждает взаимосвязь процессов воспаления, нарушений энергетического и глутаматного метаболизма, а также окислительного стресса, их вовлеченность в развитие юношеских депрессий с аттенуированными симптомами шизофрении и различную выраженность нарушений этих метаболических систем у пациентов с различными психопатологическими особенностями.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет бюджетного финансирования по госзаданию на 2019–2023 гг. темы НИР “Нейрохимические и нейроиммунные взаимосвязи, включая пептидную регуляцию, при эндогенных психических и нейродегенеративных заболеваниях; создание математических моделей для клинического применения” (№ госрегистрации АА-АА-А19-119040490097-2).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Проведение исследования одобрено Этическим комитетом ФГБНУ НЦПЗ (Протокол № 8 от 26.02.2019) и выполнено с соблюдением современных этических норм и правил биомедицинских исследований, утвержденных Хельсинкским соглашением Всемирной медицинской ассоциации (в ред. 1975/2000 гг.).

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Comer A.L., Carrier M., Tremblay M.-È., Cruz-Martin A. // *Front Cell Neurosci.* 2020. V. 14. P. 274. doi: 10.3389/fncel.2020.00274
2. Richardson B., MacPherson A., Bambico F. // *Brain Behav Immun Health.* 2022. V. 26. P. 100554. doi: 10.1016/j.bbih.2022.100554
3. Ключник Т.П., Смулевич А.Б., Зозуля С.А., Воронина Е.И. // *Психиатрия.* 2021. Т. 19. № 1. С. 6–15. doi: 10.30629/2618-6667-2021-19-1-6-15
4. DiSabato D.J., Quan N., Godbout J.P. // *J Neurochem.* 2016. V. 139. Suppl 2. P. 136–153. doi: 10.1111/jnc.13607
5. Miller B.J., Goldsmith D.R. // *Focus (Am. Psychiatr. Publ.).* 2020. V. 18. № 4. P. 391–401. doi: 10.1176/appi.focus.20200015
6. Bien C.G., Rohleder C., Mueller J.K., Bien C.I., Koethe D., Leweke F.M. // *Front. Psychiatry.* 2020. V. 12. P. 654602. doi: 10.3389/fpsy.2021.654602
7. Beydoun M.A., Obhi H.R., Weiss J., Canas J.A., Beydoun H.A., Evans M.K., Zonderman A.B. // *Mol Psychiatry.* 2020. V. 25. № 6. P. 1286–1300. doi: 10.1038/s41380-019-0408-2
8. Малашенкова И.К., Крынский С.А., Огурцов Д.П., Мамошина М.В., Захарова Н.В., Ушаков В.Л.,

- Величковский Б.М., Дидковский Н.А. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2018. Т. 118. № 12. С. 72–80.
doi: 10.17116/jnevro201811812172
9. Osimo E.F., Pillinger T., Rodriguez I.M., Khandaker G.M., Pariante C.M., Howes O.D. // *Brain Behav Immun*. 2020. V. 87. P. 901–909.
doi: 10.1016/j.bbi.2020.02.010
 10. Ключник Т.П., Смудевич А.Б., Зозуля С.А., Романов Д.В., Лобанова В.М. Клинико-иммунологические аспекты бредовых расстройств при параноидной шизофрении // *Психиатрия*. 2023. Т. 21. № 2. С. 6–16.
doi: 10.30629/2618-6667-2023-21-2-6-16
 11. Ключник Т.П., Зозуля С.А., Олейчик И.В., Левченко Н.С., Субботская Н.В., Бархатова А.Н., Сафарова Т.П., Омельченко М.А., Андросова Л.В. // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2021. Т. 121. № 5. Вып. 2. С. 67–74.
doi: 10.17116/jnevro202112105267
 12. Koga M., Serritella A.V., Sawa A., Sedlak T.W. // *Schizophr Res*. 2016. V. 176. № 1. P. 52–71.
doi: 10.1016/j.schres.2015.06.022
 13. Nakazawa K., Sapkota K. // *Pharmacol Ther*. 2020. V. 205. P. 107426.
doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.107426
 14. Moriguchi S., Takamiya A., Noda Y., Horita N., Wada M., Tsugawa S., Plitman E., Sano Y., Tarumi R., ElSalhy M., Katayama N., Ogyu K., Miyazaki T., Kishimoto T., Graff-Guerrero A., Meyer J.H., Blumberger D.M., Daskalakis Z.J., Mimura M., Nakajima S. // *Mol Psychiatry*. 2019. V. 24. № 7. P. 952–964.
doi: 10.1038/s41380-018-0252-9
 15. Merritt K., McCutcheon R.A., Aleman A., Ashley S., Beck K., Block W., Bloemen O.J.N., Borgan F., Boules C., Bustillo J.R., Capizzano A.A., Coughlin J.M., David A., de la Fuente-Sandoval C., Demjaha A., Dempster K., Do K.Q., Du F., Falkai P., Galińska-Skok B., Gallinat J., Gasparovic C., Ginestet C.E., Goto N., Graff-Guerrero A., Ho B.C., Howes O., Jauhar S., Jeon P., Kato T., Kaufmann C.A., Kegeles L.S., Keshavan M.S., Kim S.Y., King B., Kunugi H., Lauriello J., León-Ortiz P., Liemburg E., McIlwain M.E., Modinos G., Mouchlianitis E., Nakamura J., Nenadic I., Öngür D., Ota M., Palaniyappan L., Pantelis C., Patel T., Plitman E., Posporelis S., Purdon S.E., Reichenbach J.R., Renshaw P.F., Reyes-Madriral F., Russell B.R., Sawa A., Schaefer M., Shungu D.C., Smesny S., Stanley J.A., Stone J., Szulc A., Taylor R., Thakkar K.N., Théberge J., Tibbo P.G., van Amelsvoort T., Walecki J., Williamson P.C., Wood S.J., Xin L., Yamasue H., McGuire P., Egerton A.; *IN-MRS in Schizophrenia Investigators* // *Mol Psychiatry*. 2023.
doi: 10.1038/s41380-023-01991-7
 16. Савушкина О.К., Бокша И.С., Терешкина Е.Б., Прохорова Т.А., Воробьева Е.А., Бурбаева Г.Ш. // *Психиатрия*. 2018. № 1(77). С. 16–25.
doi: 10.30629/2618-6667-2018-77-16-25
 17. Серёгин А.А., Смирнова Л.П., Дмитриева Е.М., Васильева С.Н., Семке А.В., Иванова С.А. // *Психиатрия*. 2020. Т. 18. № 3. С. 22–31.
doi:10.30629/2618-6667-2020-18-3-22-31
 18. Savushkina O.K., Tereshkina E.B., Prokhorova T.A., Boksha I.S., Burminskii D.S., Vorobyeva E.A., Morozova M.A., Burbaeva G.S. // *J Med Biochem*. 2020. V. 39. № 1. P. 54–59.
doi: 10.2478/jomb-2019-0018
 19. Koike H., Chaki S. // *Behav Brain Res*. 2014. V. 271. P. 111–115.
doi: 10.1016/j.bbr.2014.05.065
 20. Huang X., Ding W., Wu F., Zhou S., Deng S., Ning Y. // *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2020. V. 16. P. 263–271.
doi: 10.2147/NDT.S239763
 21. Fenn-Moltu S., Deakin B., Drake R., Howes O.D., Lawrie S.M., Lewis S., Nikkheslat N., Walters J.T.R., MacCabe J.H., Mondelli V., Egerton A. // *Brain Behav Immun*. 2023. V. 111. P. 343–351.
doi: 10.1016/j.bbi.2023.05.005
 22. Haroon E., Miller A.H., Sanacora G. // *Neuropsychopharmacology*. 2017. V. 42. № 1. P. 193–215.
doi: 10.1038/npp.2016.199
 23. Hodo T.W., de Aquino M.T.P., Shimamoto A., Shanker A. // *Front Immunol*. 2020. V. 11. P. 1869.
doi:10.3389/fimmu.2020.01869
 24. Савушкина О.К., Терешкина Е.Б., Прохорова Т.А., Бокша И.С., Сафарова Т.П., Яковлева О.Б., Корнилов В.В., Шупилова Е.С., Воробьева Е.А., Бурбаева Г.Ш. // *Психиатрия*. 2021. Т. 19. № 4. С. 34–41.
doi:10.30629/2618-6667-2021-19-4-34-41
 25. Ansari Z., Pawar S., Seetharaman R. // *Postgrad Med*. 2022. V. 134. № 2. P. 187–199.
doi: 10.1080/00325481.2021.2006514
 26. Czarny P., Wigner P., Gałeczki P., Śliwiński T. // *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018. V. 80. Pt C. 309–321.
doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.06.036
 27. Xin H., Cui Y., An Z., Yang Q., Zou X., Yu N. // *RSC Adv*. 2019. V. 9. № 60. P. 34735–34743.
doi: 10.1039/c9ra03848e
 28. Mandal P.K., Gaur S., Roy R.G., Samkaria A., Ingole R., Goel A. // *ACS Chem Neurosci*. 2022. V. 13. № 19. P. 2784–2802.
doi: 10.1021/acscchemneuro.2c00420
 29. Савушкина О.К., Бокша И.С., Омельченко М.А., Терешкина Е.Б., Прохорова Т.А., Воробьева Е.А., Бурбаева Г.Ш. // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2022. Т. 122. № 8. С. 136–144.
doi: 10.17116/jnevro2022122081136
 30. Терешкина Е.Б., Савушкина О.К., Бокша И.С., Прохорова Т.А., Воробьева Е.А., Омельченко М.А., Помыткин А.Н., Каледва В.Г., Бурбаева Г.Ш. //

- Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2019. Т. 119. № 2. С. 61–65. doi:10.17116/jnevro201911902161
31. Miller T.J., McGlashan T.H., Woods S.W., Stein K., Driesen N., Corcoran C.M., Hoffman R., Davidson L. // *Psychiatr. Q.* 1999. V. 70. № 4. P. 273–287.
32. Ключник Т.П., Зозуля С.А., Андросова Л.В., Сарманова З.В., Отман И.Н., Дупин А.М., Столяров С.А., Шипилова Е.С., Борисова О.А. // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2014. Т. 114. Вып. 3. № 2. С. 37–42.
33. Смородинский С.С., Батин Н.В. Методы анализа и принятия решений в слабоструктурированных задачах: учеб. пособие по курсу “Методы и системы принятия решений” для студентов специальности “Автоматизированные системы обработки информации”. Минск: БГУИР, 2002. 116 с.

Markers of Inflammation, Energy and Glutamate Metabolism, and Antioxidant Defense in Patients with Adolescent Depression

S. A. Zozulya¹, O. K. Savushkina¹, T. A. Prokhorova¹, E. B. Tereshkina¹, I. S. Boksha¹, M. A. Omelchenko¹, and T. P. Klyushnik¹

¹*Mental Health Research Center, Moscow, Russia*

The involvement of inflammation, disturbances of glutamate metabolism and oxidative stress in the pathogenesis of schizophrenia and affective disorders has been proven by numerous studies. It seems relevant to assess the role of these systems in the development of prodromal stages of schizophrenia in juvenile patients with depression. The aim of this study was to investigate the connection between markers of inflammation, energy and glutamate metabolism, and antioxidant defense with the clinical features of patients with adolescent depression. 74 males aged 16–25 years with a first depressive episode (F32.1–2, F32.38, F32.8) were observed: 32 subjects with attenuated positive symptoms, 22 persons with attenuated negative symptoms, 20 individuals without attenuated schizophrenia symptoms. The control group included 57 mentally healthy adults aged 16–25 years. The activity of leukocyte elastase and α 1-proteinase inhibitor, the level of autoantibodies to S100B and myelin basic protein in plasma and the activity of cytochrome *c*-oxidase, glutamate dehydrogenase, glutathione reductase and glutathione-S-transferase in platelets were determined. Within each clinical group, differences in the profiles of immunological and biochemical parameters were identified. Division of patients into clusters according to all biological parameters showed different level of inflammation and changes of glutamate metabolism and antioxidant defense related to the features of psychopathological symptoms. The results confirm the connection of the studied metabolic systems and their different involvement to the development of adolescent depression with different psychopathological structure, which is important to assess the role of these systems in the trajectory of the disease and early therapeutic correction.

Keywords: juvenile depression, attenuated symptoms of schizophrenia, biomarkers, (neuro)inflammation, glutamate metabolism, oxidative stress

ДИНАМИКА СООТНОШЕНИЙ ПРОЛАКТИНА И ГОРМОНОВ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-ТИРЕОИДНОЙ ОСИ У ПАЦИЕНТОВ С ШИЗОФРЕНИЕЙ

© 2024 г. Л. Н. Горобец¹*, А. В. Литвинов¹, В. С. Буланов¹

¹Московский НИИ психиатрии – филиал ФГБУ «НМИЦПН им. В. П. Сербского» Минздрава России, Москва, Россия

*E-mail: gorobetsln@mail.ru

Поступила в редакцию 03.06.2023 г.

После доработки 30.06.2023 г.

Принята к публикации 02.07.2023 г.

У 70 обследованных пациентов – 34 с первым психотическим эпизодом (ППЭ) и 36 с хронической шизофренией (ХШ) – проведено динамическое исследование показателей пролактина (ПРЛ), тиреотропного гормона (ТТГ) и тироксина (T_4) свободного в процессе терапии оланзапином. Было показано, что у 52.9% пациентов с ППЭ отмечалась фоновая гиперпролактинемия (ГП) со средними значениями 971.1 ± 420 мМЕ/л, а в группе с ХШ – у 50% пациентов (средние значения пролактина – 1131 ± 845.4 мМЕ/л). У 11.8% пациентов с ППЭ и у 16.6% пациентов с ХШ уровень T_4 св. был ниже нормативных значений (средние значения: 7.5 ± 0.3 пмоль/л и 8.0 ± 0.8 пмоль/л соответственно). Показатели ТТГ у пациентов с ППЭ находились в пределах референсных значений. Повышенные фоновые уровни ТТГ у пациентов с ХШ отмечались в 11.1% случаев (4.8 ± 0.7 мкМЕ/мл). К 6–8 неделе отмечено повышение средних показателей ПРЛ у всех пациентов. Колебания уровней тиреоидных гормонов к концу терапии были незначительными. Выделены четыре варианта динамических изменений ПРЛ и гормонов ГГТ-оси у пациентов в процессе терапии оланзапином. Обсуждаются вопросы взаимосвязи ПРЛ и гормонов тиреоидной оси. Полученные данные диктуют необходимость исследования особенностей соотношения уровней указанных гормонов до начала антипсихотической терапии (АТ) в целях раннего выявления гипотиреоза и ГП, а также профилактики развития указанных гормональных дисфункций в процессе АТ и подтверждают необходимость оценки уровней ПРЛ и гормонов ГГТ-оси у пациентов с ППЭ и ХШ до начала назначения им АТ.

Ключевые слова: первый психотический эпизод (ППЭ), шизофрения, пролактин (ПРЛ), тиреотропный гормон, тироксин, оланзапин

DOI: 10.31857/S1027813324010048, EDN: GZFUNЕ

ВВЕДЕНИЕ

В отечественной и зарубежной литературе в последние годы не уменьшается повышенный интерес к биологическим, в частности гормональным, подходам в изучении проблемы шизофрении.

К настоящему времени установлено, что развитие клинко-психопатологической симптоматики (включающей позитивную и негативную), а также нейрокогнитивный дефицит у больных шизофренией связаны в основном с нарушениями функционирования дофаминергической и серотонинергической медиаторных систем [1, 2, 3]. Исходя из этого, применяемая антипсихотическая терапия (АТ) направлена на восстановление баланса указанных систем. Также известно, что регуляция в эндокринной системе, а именно, регуляция секреции тропных гормонов, в частности,

пролактина (ПРЛ) и тиреотропного гормона (ТТГ) находится под моноаминергическим контролем, и наоборот [4, 5]. В этом контексте особое внимание уделяется исследованиям пациентов с первым психотическим эпизодом (ППЭ), ранее не получивших АТ, а также выявлению взаимоотношений между различными гормональными параметрами в процессе АТ указанного контингента больных [6–9]. К настоящему времени опубликованы данные гормональных исследований у больных с ППЭ в сравнении с хронической формой шизофрении (ХШ), касающиеся в основном таких гормональных показателей, как ПРЛ, гормоны гипоталамо-гипофизарно-гонадной (ГГГ) и гипоталамо-гипофизарно-адреналовой (ГА) осей [10–18].

Вместе с тем следует признать, что остается открытым достаточно широкий круг вопросов,

связанных с установлением взаимоотношений между ПРЛ и гормонами ГГТ-оси (ТТГ и тироксин – T_4 свободный) и особенностями их дисбаланса в указанных группах больных в процессе проведения АТ [19–23].

Интерес к проблеме этих взаимоотношений связан не в последнюю очередь с наличием физиологически обусловленной общностью регуляции секреции ПРЛ и ТТГ. Показано, что в большинстве случаев нейромедиаторы (дофамин и серотонин) регулируют секрецию ПРЛ и ТТГ на гипоталамическом уровне и на уровне туберинфундибулярной дофаминергической системы в ЦНС. Среди гипоталамических нейрогормонов, стимулирующих секрецию ПРЛ, выделяют тиреотропин-релизинг гормон (ТРГ), окситоцин и вазоактивный интестинальный полипептид (ВИП). Кроме того, мощным стимулятором секреции ПРЛ является и ТТГ [24]. Даже низкая доза ТРГ, способная стимулировать секрецию ТТГ, одновременно стимулирует и секрецию ПРЛ. Однако в большинстве физиологических ситуаций секреция ТТГ и ПРЛ контролируется независимо друг от друга – например, лактация не приводит к увеличению секреции ТТГ, а первичный гипотиреоз достаточно редко сопровождается избыточной продукцией ПРЛ. Ингибирующее влияние на секрецию ПРЛ, помимо основного ингибитора – дофамина, оказывают, в частности, и гормоны гипоталамо-гипофизарно-тиреоидной (ГГТ) оси [25].

Изучению секреции ПРЛ у больных с ППЭ посвящено незначительное число работ и до настоящего времени нет единого мнения, а также убедительных доказательств того, что исходные уровни ПРЛ аномальны у больных с ППЭ.

Так, например, по данным Aston J. et al. (2010), у 46% больных с ППЭ, ранее не получавших АТ, выявляется наличие гиперпролактинемии (ГП). Авторы предполагают, что ГП при шизофрении не обязательно связана с АТ. К настоящему времени установлено, что особенности секреции ПРЛ у больных с ППЭ обусловлены наличием дисбаланса между дофамином и серотонином в туберинфундибулярной области ЦНС [8].

Следует отметить малочисленность исследований в отношении состояния ГГТ-оси и ПРЛ у больных с ППЭ, вместе с тем, интерес к проблеме ГП и дисбаланса гормонов ГГТ-оси у больных шизофренией находится на довольно значительном уровне, но вместе с тем остается большое количество спорных и неоднозначных мнений [26–30].

В этой связи представляется актуальным проведение динамического исследования показателей ПРЛ, ТТГ и T_4 св. и их взаимосвязи у больных с ППЭ в сравнении с больными с ХШ в целях изучения особенностей формирования ГП и дисбаланса тиреоидных гормонов при проведении АТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Было обследовано 70 пациентов в возрасте от 18 до 53 лет (средний возраст 30.5 ± 9.2 лет), находившихся на стационарном лечении в клиниках МНИИП – филиала ФГБУ “НМИЦПН имени В. П. Сербского” Минздрава России и отделений ГКП № 4 им. П. Б. Ганнушкина в 2018–2022 гг.

Общие критерии включения в исследование: возраст от 18 до 53 лет; наличие заболеваний шизофренического спектра в соответствии с критериями МКБ-10 (International Classifications of Diseases, Revision, Clinical Modification, ICD-10-CM); баллы по шкале PANSS > 60 [31]; терапия оланзапином; для пациентов с ХШ – wash-out-период в течение 7–10 дней перед назначением оланзапина в тех случаях, когда больные до начала исследования получали антипсихотическую терапию. Критерии исключения: органические заболевания ЦНС; эндокринные заболевания; тяжелые формы соматических и гинекологических заболеваний; беременность и лактация. Исследование одобрено ЛЭК МНИИП – филиала ФГБУ “НМИЦПН имени В. П. Сербского” Минздрава России по теме “Исследования метаболических и гормональных изменений у ранее не лечившихся больных шизофренией с впервые возникшими психотическими расстройствами (Протокол № 111/4 от 11 марта 2013 г.).

Основную группу составили 34 пациента с ППЭ (12 мужчин и 22 женщины), из них с диагнозом параноидная шизофрения F20.0 – 30 пациентов и шизоаффективное расстройство F 25.0 – 4 пациента. Средний возраст – 27.36 ± 1.24 лет; средняя длительность заболевания – 0.23 ± 0.08 лет. В качестве группы сравнения были обследованы 36 пациентов с ХШ (11 мужчин и 25 женщин), из них с диагнозом параноидная шизофрения F20.0 – 31 пациент и шизоаффективное расстройство F 25.0 – 5 пациентов. Средний возраст – 30.09 ± 1.25 лет, средняя длительность заболевания – 12.77 ± 0.6 лет.

Больные получали терапию оланзапином в дозе от 5 до 20 мг в сутки, инъекционно или в таблетированной форме (средняя суточная доза составляла 14.6 ± 6.6 мг). Исследуемые группы пациентов были сопоставимы по полу, возрасту и диагностическим категориям. Длительность заболевания пациентов с ХШ значимо ($p = 0.00043$) превышала таковую у пациентов с ППЭ. Редукция общего балла по шкале PANSS более чем на 25% к 6-й неделе терапии оланзапином давала возможность регистрировать положительный результат и расценивать данных пациентов как респондеров.

Дизайн исследования – открытое, сравнительное, проспективное, нерандомизированное. Исследование пациентов проводилось до назначения ПФТ (пациенты с ППЭ) или сразу после

периода отмены до назначения оланзапина (пациенты с ХШ) и на 6–8 неделе терапии. Сравнительный анализ изучаемых параметров проводился как между группами, так и внутри групп с учетом динамических соотношений уровней ПРЛ, ТТГ и T_4 св. В данной работе изучение динамики уровней указанных гормонов проводилось без учета гендерных различий по уровням ПРЛ. Это допущение было возможным в связи с незначительной разницей показателей ПРЛ у мужчин и женщин. Описание клинико-психопатологических и эндокринных параметров исследованных пациентов приведены в нашей публикации [32].

Определение содержания гормонов ПРЛ, ТТГ и T_4 св. проводилось натошак в утренние часы в сыворотке крови иммуноферментным методом на фотометре вертикального сканирования MultiscanAgent (Labsystems, Финляндия) с использованием реактивов фирмы “АлкорБио”. Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием компьютерной статистической программы “Statistica” (версия 10.0) с вычислением средних значений (M) и ошибки среднего ($\pm SE$). Для сравнения показателей применялись непараметрические методы статистической оценки: для сравнения двух зависимых переменных – критерий Вилкоксона, анализ межгрупповых различий проводился с помощью теста Манна – Уитни. Для исследования взаимосвязи между переменными использовался ранговый коэффициент корреляции Спирмена (r). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Референсные значения гормонов составляли: ПРЛ – 50–700 мМЕ/л, ТТГ – 0,23–3,4 мкМЕ/мл, T_4 св. – 10–23,5 пмоль/л.

Средние фоновые значения уровней изучаемых гормонов у пациентов с ППЭ находились в нормативном диапазоне (ПРЛ – 615.6 ± 485.7 мМЕ/л; ТТГ – 2.7 ± 1.4 мкМЕ/мл; T_4 св. – 12.8 ± 8.1 нмоль/л), а у больных с ХШ только средние показатели ПРЛ незначительно превышали верхнюю границу нормы (ПРЛ – 853.1 ± 547.4 мМЕ/л; ТТГ – 2.3 ± 1.7 мкМЕ/мл; T_4 св. – 12.4 ± 8.5 нмоль/л).

Вместе с тем у 52.9% пациентов ППЭ отмечалась фоновая ГП (971.1 ± 420 мМЕ/л), а в группе с ХШ – у 50% пациентов (1131 ± 845.4 мМЕ/л).

У 11.8% пациентов основной группы и у 16.6% пациентов группы сравнения уровень T_4 св. был ниже нормативных значений (средние значения: 7.5 ± 0.3 и 8.0 ± 0.8 пмоль/л соответственно).

Показатели ТТГ у пациентов с ППЭ находились в пределах референсных значений. Повышенные фоновые уровни ТТГ у пациентов с ХШ отмечались в 11.1% случаев (4.8 ± 0.7 мкМЕ/мл).

К 6–8 неделе отмечено повышение средних показателей ПРЛ у пациентов как в основной группе, так и в группе сравнения. При этом у 58.8% пациентов с ППЭ средние значения гормона составили 1259.8 ± 460.3 мМЕ/л, а у 55.5% пациентов с хронической шизофренией – 1254.4 ± 340.4 мМЕ/л.

Динамика изменений средних значений уровня T_4 св. была сходной в обеих группах – незначительное снижение к 6–8 неделе. В основной группе у 29.4% пациентов и в группе сравнения – у 27.7% пациентов уровень гормона был ниже нормативных значений (8.7 ± 1.0 и 8.78 ± 1.2 пмоль/л соответственно).

Средние уровни ТТГ незначительно снижались и к 6–8 неделе у всех пациентов соответствовали нормативным значениям.

Значимых различий в средних показателях уровней изучаемых гормонов между основной группой и группой сравнения не выявлено, их можно было оценить на уровне тенденций. При проведении корреляционного анализа у больных с ППЭ была выявлена положительная корреляция между уровнями ТТГ и ПРЛ на 6–8 неделе терапии ($r = 0.6$; $p = 0.0096$). Аналогичная корреляция была выявлена у пациентов с ХШ ($r = 0.6$; $p = 0.008$).

Более детальный анализ динамики ПРЛ и гормонов ГГТ-оси позволил сформировать четыре подгруппы пациентов в каждой из исследованных групп, имеющих характерные особенности изменений изучаемых показателей в процессе АТ. Описание клинических проявлений ГП и дистиреоза приведены в статье (ссылка).

Подгруппа 1: пациенты с повышением уровня ПРЛ, повышением уровней ТТГ и снижением T_4 св. (ППГТ).

Подгруппа 2: пациенты с повышением уровня ПРЛ и разнонаправленными изменениями уровней ТТГ и T_4 св. (ППД).

Подгруппа 3: пациенты со снижением уровня ПРЛ и разнонаправленными изменениями уровней ТТГ и T_4 св. (СПД).

Подгруппа 4: пациенты с нормативными уровнями ПРЛ и ТТГ, отсутствием их изменений, но со снижением T_4 св. – синдром снижения T_4 св. (ССТ 4).

У пациентов с ППЭ по сравнению с пациентами с ХШ значимо ($p = 0.0042$) чаще встречается сочетание ГП и разнонаправленных изменений ТТГ и T_4 св. (2 подгруппа) – 53 и 28% соответственно. Доля пациентов из подгрупп ППГТ и ССТ₄ св., в совокупности выше в группе с ХШ по сравнению с пациентами с ППЭ: 39 и 24% соответственно. Частота представленности больных 3-й подгруппы (СПД) в обеих группах значимо не различалась (1-я группа – 23%; 2-я группа – 33%), но вместе с тем процент пациентов с указанной динамикой

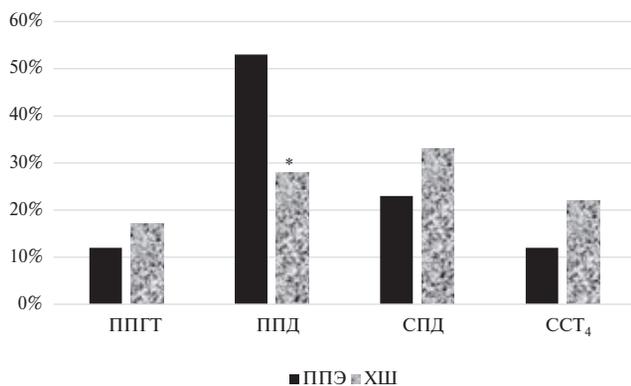


Рис. 1. Частота встречаемости выделенных подгрупп пациентов.

гормонов был выше у больных ХШ. Можно предположить, что такая разница вариантов динамики изучаемых гормонов обусловлена более активными стресс-реакциями у пациентов с ППЭ, тогда как, хронификация заболевания приводит к “сглаживанию” реактивности организма и более равномерному распределению различных вариантов динамических изменений уровней ПРЛ, ТТГ и T_4 св. (рис. 1).

Особенности динамики уровней исследованных гормонов в выделенных подгруппах представлены в табл. 1, 2.

Как видно из данных табл. 1, в 1-й подгруппе пациентов с ППЭ средний фоновый уровень ПРЛ находился в пределах референсных значений. В процессе терапии оланзапином происходило его повышение более чем в два раза, что согласуется с рядом исследований [6, 7, 15, 21]. Кроме того, отмечалось повышение уровней ТТГ и снижение уровней T_4 св. в пределах нормативных значений. Данные различия не достигли статистической значимости из-за малочисленности выборки.

Во 2-й подгруппе (ППД) также отмечалось повышение уровня ПРЛ. Двукратное увеличение среднего уровня ПРЛ к 6–8 неделе достигало уровня статистической значимости ($p = 0,007$). На фоне повышения средних значений уровня ПРЛ происходило незначительное снижение уровня ТТГ и практически отсутствовали изменения средних значений T_4 св. Средние уровни гормонов находились в пределах референсных значений.

В отличие от первых двух подгрупп в 3-й группе отмечена противоположная динамика средних уровней ПРЛ: фоновые показатели были повышены у всех пациентов, а к концу исследования они снижались до референсных значений. При этом отмечались незначительные разнонаправленные колебания ТТГ и T_4 св.

Как видно из данных табл. 1, у пациентов четвертой подгруппы (ССТ₄) уровни ПРЛ и ТТГ при терапии оланзапином практически не изменялись. Вместе с тем у всех пациентов прослеживалась тенденция к снижению показателей T_4 св., и в 50% случаев T_4 св. к 6–8 неделе находился ниже нормативных значений.

У пациентов с ХШ в подгруппе ППГТ наблюдалась сходная с пациентами с ППЭ динамика изменений уровней ПРЛ, ТТГ и T_4 св. Межгрупповых различий средних значений гормонов выявлено не было. Вместе с тем изменения уровней ТТГ и T_4 св. были менее выражены по сравнению с пациентами с ППЭ.

Во 2-й подгруппе наблюдалось значимое ($p = 0,0043$) трехкратное повышение уровня ПРЛ к 6–8 неделе терапии. Уровни ТТГ незначительно снижались, а T_4 св. — повышались в пределах нормативных значений.

В подгруппе СПД фоновые показания ПРЛ были повышены, а к 6–8 недели терапии оланзапином отмечалось снижение уровня гормона у всех пациентов, при этом разница между фоновыми и конечными значениями достигала уровня значимости ($p = 0,041$). Также были выявлены значимые ($p = 0,047$) межгрупповые различия по фоновым средним уровням ПРЛ пациентами с ППЭ и ХШ — более высокие фоновые значения были выявлены у пациентов с ХШ. Уровни ТТГ имели незначительную тенденцию к снижению, а уровень T_4 св. имел небольшие колебания в пределах референсных значений.

Фоновый уровень ПРЛ в подгруппе ССТ₄ соответствовал нормативным значениям у всех пациентов этой группы, но в 2 раза превышал таковой у пациентов с ППЭ. Динамика уровней тиреоидных гормонов выражалась в незначительных колебаниях уровней ТТГ в диапазоне референсных значений и снижением уровней T_4 св. у всех пациентов. При этом у 75% больных к 6–8 неделе уровень T_4 св. был ниже нормативных показателей.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами данные о наличии фоновой ГП у части больных с ППЭ согласуются с рядом исследований [21, 32, 33].

ГП в определенной мере может быть обусловлена общим стрессовым состоянием, ассоциируемым как с самим психическим заболеванием, так и с патологическими стресс-реакциями, вызываемыми ГП [8, 33, 34].

Хорошо известно, что дофаминергическая нейротрансмиссия (ДН) при психозах усиливается. Также известно, что дофамин является наиболее важным ингибирующим выработку ПРЛ фактором. Реципрокное взаимодействие между ПРЛ

Таблица 1. Особенности динамики уровней ПРЛ, ТТГ, Т₄ св. у пациентов с ППЭ в выделенных подгруппах*

Гормоны	Время исследования	Группа			
		1-я	2-я	3-я	4-я
ПРЛ	Фон	449.5 ± 217	556.9 ± 312	1039 ± 445	199 ± 87
	6–8 нед.	1032.5 ± 325.1	1213 ± 243.2*	539.4 ± 216.3	164 ± 56
ТТГ	Фон	1.0 ± 0.2	3.7 ± 1.3	1.9 ± 1.2	1.8 ± 0.3
	6–8 нед.	2.15 ± 0.3	2.1 ± 0.8	2.0 ± 1.4	1.8 ± 0.5
Т ₄ св.	Фон	18.7 ± 5.1	12.9 ± 4.4	10.8 ± 0.3	10.2 ± 2.4
	6–8 нед.	12.1 ± 0.2	13.4 ± 3.6	9.7 ± 3.5	8.9 ± 1.1

p* = 0.007.Таблица 2.** Особенности динамики уровней ПРЛ, ТТГ, Т₄ св. у пациентов с ХШ*

Гормоны	Время исследования	Группа			
		1-я	2-я	3-я	4-я
ПРЛ	Фон	620.6 ± 120	408 ± 301.5	1539.8 ± 375	553.5 ± 226.7
	6–8 нед.	1166.3 ± 230.4	1308.2 ± 625.7	702 ± 174*	454.5 ± 288
ТТГ	Фон	1.4 ± 0.4	2.12 ± 1.1	2.86 ± 1.8	2.4 ± 0.1
	6–8 нед.	2.0 ± 0.5	1.84 ± 0.9	2.1 ± 1.1	2.3 ± 0.1
Т ₄ св.	Фон	18.3 ± 8.1	11.54 ± 4.5	10.35 ± 1.9	12 ± 2.5
	6–8 нед.	14.0 ± 3.7	13 ± 2.7	10.3 ± 1.7	9.6 ± 1.3

**p* = 0.041.

и выработкой дофамина гипоталамусом было подтверждено в ряде исследований [35, 36]. Это подтверждает тот факт, что стресс индуцирует ГП и что повышение ДН при психозе представляет собой хотя бы частично регуляторный механизм, способствующий снижению уровня ПРЛ [8].

Выявляемая у больных с ХШ фоновая ГП (не смотря на wash-out-период) со всей очевидностью обусловлена предшествующей психофармакотерапией, что также соответствует данным литературы [4, 37–41].

Полученные данные о динамике средних показателей ТТГ и тироксина у больных с ППЭ и ХШ оказались малоинформативными. В то же время выявленные положительные корреляционные взаимосвязи между изменениями уровней ПРЛ и ТТГ в процессе терапии оланзапином, который относится к поливалентным атипичным антипсихотикам трициклической дибензодиазепиновой структуры с более сильным влиянием на 5-HT_{2a}-рецепторы, по сравнению с D₂- и D₃-рецепторами в определенной мере позволяют предположить наличие общности регуляции этих гормонов на гипоталамо-гипофизарном уровне в процессе

восстановления баланса моноаминергических систем [24].

Выделение подгрупп пациентов с различной динамикой изучаемых гормонов позволило более глубоко проанализировать особенности гормонального дисбаланса.

Следует подчеркнуть, что секреция ТТГ регулируется не только по принципу обратной связи, но и зависит от множества других факторов, включая генетические особенности, аллостатическую нагрузку, психосоциальный стресс и прием лекарств, которые могут изменить баланс ГГТ-оси [42, 43].

И если в отношении изменений уровня ПРЛ у пациентов с шизофренией как до, так и в процессе АП имеется определенный консенсус мнений, исходя из дофаминовой концепции шизофрении, то особенности функционирования ГГТ-оси у указанного контингента пациентов не до конца ясны. Высказывается мнение, что разнонаправленные колебания гормонов ГГТ-оси у пациентов с шизофренией предположительно могут быть связаны с вовлеченностью в патогенез шизофрении и других нейрохимических систем, в частности ГАМКергической [44, 45].

Так, по мнению Wiens и др., клинические данные свидетельствуют о том, что ряд психических заболеваний с участием ГАМКергической системы связаны с дисфункцией щитовидной железы (например, гипертиреозом или гипотиреозом). Имеются экспериментальные данные исследований *in vivo* и *in vitro* на крысах и мышах, указывающие на то, что ТГ влияют на несколько компонентов системы ГАМК. К ним относятся влияние на активность ферментов, ответственных за синтез и деградацию ГАМК, уровни глутамата и ГАМК, высвобождение и обратный захват ГАМК, а также экспрессию и функцию рецепторов ГАМК (А). С другой стороны, у крыс и людей ГАМК ингибирует высвобождение тиреотропного гормона (ТТГ) из гипофиза, возможно, за счет действия непосредственно на гипофиз или на нейроны гипоталамического тиреотропин-высвобождающего гормона. У мышей ГАМК ингибирует стимулированное ТТГ высвобождение ТГ из щитовидной железы. В совокупности эти исследования подтверждают гипотезу о взаимной регуляции систем щитовидной железы и ГАМК у позвоночных [46].

С другой стороны, возможным объяснением выявленного дисбаланса гормонов щитовидной железы у пациентов может быть влияние АТ. Отчасти понижение концентрации свободного тироксина в сыворотке крови объясняется влиянием антипсихотиков на изменение активности йодтирониндейонидазы. Данный фермент существует в трех типах: D₁, D₂, D₃. Дейонидаза 2-го типа катализирует превращение тироксина в биологически активный трийодтиронин [47]. Фермент 3-го типа отвечает за инактивацию трийодтиронина и, меньшей степени, предотвращает активацию тироксина. Существует гипотеза, что антипсихотические препараты потенцируют активность дейонидазы 2-го типа, что ведет к повышению содержания трийодтиронина в тканях головного мозга и снижению концентрации тироксина в сыворотке крови [48].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, как показывают полученные нами данные динамических исследований ПРЛ и гормонов ГГТ-оси в процессе АТ, а также результаты научной литературы по указанной тематике, остается много неясных вопросов о механизмах их взаимодействия, нейробиологических свойствах, потенциальной вовлеченности в развитии проявлений шизофрении изменений их уровней в процессе АТ. Область этих исследований в последние годы быстро расширяется.

К ограничениям настоящего исследования относятся: небольшая выборка больных, изучение только двух гормонов ГГТ-оси и терапия одним

антипсихотиком. Вместе с тем полученные нами данные о наличии ГП у ряда больных с ППЭ, ранее не получавших терапию, а также выделение четырех подгрупп с различной динамикой ПРЛ и гормонов ГГТ-оси указывают на значимость дальнейших исследований в этом направлении. Они диктуют необходимость исследования особенностей соотношения динамики уровней указанных гормонов в процессе АТ в целях раннего выявления гипотиреоза и ГП, а также профилактики развития указанных гормональных дисфункций в процессе АТ и подтверждают необходимость оценки уровней ПРЛ и гормонов ГГТ-оси у пациентов с ППЭ и ХШ до начала назначения лечения. Если уровни ПРЛ и ТТГ в сыворотке уже повышены, врачи при подборе терапии должны выбирать препараты, не влияющие на уровни пролактина и тиреотропного гормона.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках Госзадания, регистрационный номер: 121041300178-6.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии 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 г. и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Информированное согласие. От каждого пациента, принимавшего участие в исследовании, получено информированное добровольное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abi-Dargham A.* // Eur. Psychiatry. 2002. 17 (Suppl. 4). P. 341–347.
2. *Crow T.J.* // Psychopharmacol. Bull. 1982. № 18. P. 22–29.
3. *Grace A.A.* // Neurosci. 1991. № 4. P. 1–24.
4. *Лавин Л.* Эндокринология. М., 1999. 1128 с.
5. *Угрюмов М.В.* Механизмы нейроэндокринной регуляции. М.: Наука, 1999. 299 с.
6. *Горобец Л.Н., Матросова М.И.* // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2010. Т. 110. № 5. С. 17–22.
7. *Горобец Л.Н., Матросова М.И.* // Уральский журнал психиатрии, наркологии и психотерапии. Екатеринбург. 2013. Т. 1. Вып. 3. С. 29–36.
8. *Aston J., Rechsteiner E., Bull N., Borgwandt S., Gschwandner U.* // Progress in Neuro-Psychopharm. & Biol. Psychiatry. 2010. № 14. P. 1342–1344.

9. Reichelt K.L., Gardner M.L.G. // *Open Journal of Psychiatry*. 2012. № 2. P. 12–20.
10. Горобец Л.Н. Нейроэндокринные дисфункции и нейролептическая терапия. М.: Медпрактика-М, 2007. 312 с.
11. Горобец Л.Н., Литвинов А.В. // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2008. № 3. С. 71–78.
12. Barbero J.D., Gutiérrez-Zotes A., Montalvo I., Creus M., Cabezas A., Sole M., Algora M.J., Garcia-Pares G., Vilella E., Labad J. // *Schizophr. Res.* 2015. Aug. 166(1–3). P. 37–42.
13. Fryar-Williams S., Strobel J.E. // *Open Journal of Psychiatry*. 2015. № 5. P. 78–112.
14. Garner B., Pariante C.M., Wood S.J., Velakoulis D., Phillips L., Soulsby B. // *Biol. Psychiatry*. 2005. № 58. P. 417–423.
15. Segal M., Avital A., Berstein S. // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2007. Mar. 30–31(2). P. 378–382.
16. Shankar G.S., Yuan C. // *Autacoids*. 2013. № 2 (article 102).
17. Telo S., Bilgic S., Karabulut N. // *West Indian Med. J.* 2016. Mar. 15. № 65(2). P. 312–315.
18. Themeli Y., Aliko I., Hashorva A. // *European Psychiatry*. 2011. № 26. Vol. 1. Article 1515. P. S90.
19. Горобец Л.Н. // *Российский психиатрический журнал*. 2006. № 6. С. 68–75.
20. Evers S.S., van Vliet A., van Vugt B., Scheurink A.J., van Dijk G.A. // *Psychoneuroendocrinology*. 2016. Apr. № 66. P. 101–110.
21. Haddad P.M., Wieck A. // *Drugs*. 2004. № 64. P. 2291–314.
22. Jakovljevic M., Pivac N., Mihaljevic-Peles A. // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2007. Mar 30. 31(2). P. 399–402.
23. Seddigh R., Azarnik S., Keshavarz-Akhlagh A. // *Case Rep. Psychiatry*. 2015. ID678040. P. 1–4.
24. Камкин А.Г., Каменский А.А. *Фундаментальная и клиническая физиология: учебник для студ. высш. учебн. заведений*. М.: Академия, 2004. 1072 с.
25. Татарчук Т.Ф., Ефименко О.А. // *Международный эндокринологический журнал*. 2010. № 3(27).
26. Горобец Л.Н. // *Сибирский вестник психиатрии и наркологии*. 2008. № 3(50). С. 88–93.
27. Baumgartner A., Pietzcker A., Gaebel W. // *Schizophrenia Research*. 2000. № 44(3). P. 233–243.
28. Ichioka S., Terao T., Hoaki N., Matsushita T., Hoaki T. // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2012. № 39(1). P. 170–174.
29. Krysiak R., Szkróbka W., Okopień B. // *J. Clin. Pharmacol.* 2017. Dec. 18. Vol. 58. Iss. 5. P. 586–592.
30. Santos N.C., Costa P., Ruano D., Macedo A., Soares M.J., Valente J., Pereira A.T., Azevedo M.H., Palha J.A. // *Journal of Thyroid Research*. 2012. P. 11–15.
31. Мосолов С.Н. *Шкалы психометрической оценки симптоматики шизофрении и концепция негативных и позитивных расстройств*. М.: Новый цвет, 2001.
32. Горобец Л.Н., Литвинов А.В., Буланов В.С., Узбекова Д.Г. // *Социальная и клиническая психиатрия*. 2019. № 2. С. 1–5.
33. Garcia-Rizo C., Fernandez-Egea E., Oliveira C., Justicia A., Parellada E., Bernardo M., Kirkpatrick B. // *Schizophr. Res.* 2012. № 134(1). P. 16–19.
34. Jose J., Nandeesh H., Kattimani S., Meiyappan K., Sarkar S., Sivasankar D. // *Clin. Chim. Acta*. 2015. Apr. 15. № 444. P. 78–80.
35. Haddad P.M., Wieck A. // 2004. № 64. P. 2291–314.
36. Riecher-Rössler A., Rybakowski J.K., Pflueger M.O., Beyrau R., Kahn R.S., Malik P., Fleischhacker W.W. and the EUFEST Study Group // *Psychological Medicine*. 2013. № 43. P. 2571–2582.
37. Segal M., Avital A., Rojas M., Hausvater N., Sandbank S., Liba D., Moguillansky L., Tal I., Weizman A. // *Psychiatry Res.* 2004. Jul. 15. 127 (3). P. 227–235.
38. Bauer M., Whybrow P.C. // *J. Endocrinol. Invest.* 2021. Nov. № 44(11). P. 2341–2347.
39. Kahn R.S., Fleischhacker W.W., Boter H., Davidson M., Vergouwe Y., Keet I.P., Gheorghe M.D., Rybakowski J.K., Galderisi S., Libiger J., Hummer M., Dollfus S., López-Ibor J.J., Hranov L.G., Gaebel W., Peuskens J., Lindfors N., Riecher-Rössler A., Grobbee D.E.; EUFEST study group // *Lancet*. 2008. № 371. P. 1085–1097.
40. MacMaster F.P., El-Sheikh R., Upadhyaya A.R. // *Schizophr. Res.* 2007. May. № 92(1–3). P. 207–210.
41. Mondelli V., Dazzan P., Gabilondo A., Tournikioti K., Walshe M., Marshall N. // *Psychoneuroendocrinology*. 2008. № 33. P. 1004–1012.
42. Grattan D.R., Kokay I.C. // *J. Neuroendocrinol.* 2008. № 20. P. 752–763.
43. Crocker A.D., Overstreet D.H. // *Psychopharmacology*. 1984. № 82(1–2). P. 102–106.
44. Nakazawa K., Zsiros V., Jiang Z., Nakao K., Kolata S., Zhang S., Belforte J.E. // *Neuro-pharmacology*. 2012. № 62(3). P. 1574–1583.
45. Schmidt M.J., Mirnics K. // *Neuropsychopharmacology*. 2015. № 40(1). P. 190–206.
46. Wiens S.C., Trudeau V.L. // *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2006. № 144(3). P. 332–344.
47. Maino F., Cantara S., Forleo R. // *Expert Review of Endocrinology & Metabolism*. 2018. Vol. 13. No. 5. P. 273–77.
48. Marsan E.S., Bayse C.A. // *Molecules*. 2020. Vol. 25. No. 6. P. 1328.

Dynamics of Ratios of Prolactin and Hormones of the Hypothalamic-Pituitary Thyroid Axis in Patients with Schizophrenia

L. N. Gorobets¹, A. V. Litvinov¹, and V. S. Bulanov¹

¹Moscow Research Institute of Psychiatry – branch of the Federal State Budgetary Institution “Serbsky National Medical Research Centre for Psychiatry and Narcology” of the Ministry of Health of Russia, Moscow, Russia

In 70 examined patients – 34 with the first psychotic episode (FPE) and 36 with chronic schizophrenia (CS), a dynamic study of the parameters of prolactin (PRL), thyroid-stimulating hormone (TSH) and thyroxine (T4) free during olanzapine therapy was carried out. 52.9% of patients with FPE had background hyperprolactinemia (HP) with mean values of 971.1 ± 420 mIU/l, and in the group with CS, in 50% of patients (mean prolactin values were 1131 ± 845.4 mIU/l). In 11.8% of patients with FPE and in 16.6% of patients with CS, the level of T4 free was below the standard values (mean values: 7.5 ± 0.3 pmol/l and 8.0 ± 0.8 pmol/l, respectively). TSH parameters in patients with FPE were within the reference values. Elevated background levels of TSH in patients with CS were observed in 11.1% of cases (4.8 ± 0.7 mIU/ml). By 6–8 weeks, an increase in mean PRL values was observed in all patients. Fluctuations in thyroid hormone levels by the end of therapy were insignificant. Four variants of dynamic changes in PRL and hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis hormones in patients during olanzapine therapy were identified. The relationship between PRL and thyroid hormones is discussed. The data obtained dictate the need to study the characteristics of the ratio of the levels of these hormones before the start of antipsychotic therapy (AT) in order to detect hypothyroidism and HP early, as well as to prevent the development of these hormonal dysfunctions in the process of AT and confirm the need to assess the levels of PRL and HPT-axis hormones in patients with FPE and CS before the start of the appointment of AT.

Keywords: first psychotic episode, schizophrenia, prolactin, thyroid stimulating hormone, thyroxine, olanzapine

**ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *DRD3*, *GHRL*,
FTO, *LEPR*, *INSIG2*, *GSTP1*, *ABCB1* В ЛЕЙКОЦИТАХ
ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ШИЗОФРЕНИЕЙ
С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ**

© 2024 г. А. С. Бойко¹, Д. З. Падерина¹, Е. В. Михалицкая¹, Е. Г. Корнетова^{1, 2}, Н. А. Бохан^{1, 3},
С. А. Иванова^{1, 2, *}

¹Научно-исследовательский институт психического здоровья Томского национального исследовательского
медицинского центра Российской академии наук, Томск, Россия

²Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования “Сибирский
государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, Россия

³Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

*E-mail: ivanovaniipz@gmail.com

Поступила в редакцию 20.06.2023 г.

После доработки 03.07.2023 г.

Принята к публикации 04.07.2023 г.

Больные шизофренией часто страдают от такой сопутствующей патологии, как метаболический синдром, который является основным фактором риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с тяжелым бременем болезни, а также с преждевременной смертью пациентов. В исследовании изучалась экспрессия 7 генов, потенциально важных для развития метаболического синдрома. С помощью технологии QuantiGene определена экспрессия 7 изученных генов (*DRD3*, *GHRL*, *FTO*, *LEPR*, *INSIG2*, *GSTP1*, *ABCB1*) в лейкоцитах периферической крови 60 больных шизофренией, получающих антипсихотическую терапию. Результаты пилотного исследования показывают, что у больных шизофренией мужского пола с метаболическими нарушениями происходит изменение экспрессии гена *FTO*, однако, для определения роли нарушений экспрессии этого гена в развитии метаболического синдрома у больных шизофренией необходимы дальнейшие исследования.

Ключевые слова: шизофрения, метаболический синдром, экспрессия генов, *DRD3*, *GHRL*, *FTO*, *LEPR*, *INSIG2*, *GSTP1*, *ABCB1*

DOI: 10.31857/S1027813324010052, EDN: GZDJUZ

ВВЕДЕНИЕ

Частота встречаемости метаболического синдрома (МС) у больных шизофренией, получающих антипсихотическую терапию, колеблется от 28 до 46% [1–3], а ожирения – от 16,4 до 48,9% [4, 5]. МС связан с сердечно-сосудистыми факторами, что увеличивает риск преждевременной смерти у пациентов с психическими расстройствами. Гормональные регуляторы метаболизма и кодирующие их гены могут давать информацию о патогенезе и рассматриваться как потенциальные биомаркеры предрасположенности к развитию метаболического синдрома и нарушений жирового обмена [6, 7].

Достаточно хорошо изучены гены дофаминовых рецепторов, кодирующие белки, которые обеспечивают адекватную передачу сигналов

нейротрансмиттеров в восходящих дофаминергических путях из среднего мозга. Эти пути связывают области волокон, которые играют важную роль в мотивации, управляемом мышлении и системе вознаграждения, причем последняя также играет значимую роль в регуляции чувства насыщения и голода [8]. Антипсихотические препараты действуют в этих областях, в том числе блокируя D3-рецепторы, снижая уровень дофамина и, следовательно, уменьшая психотические симптомы. Однако они также могут приводить к когнитивному истощению и метаболическим изменениям [9]. Ген *DRD3* кодирует белок, который в результате альтернативного сплайсинга имеет разные изоформы. Ген D2-рецепторов (*DRD2*) также может быть вовлечен в патогенез метаболических нарушений у больных шизофренией. Было показано, что функциональный полиморфизм rs1799732 гена

DRD2 ассоциирован с лекарственно-индуцированным метаболическим синдромом у женщин [10]. Имеются данные также о влиянии гена *DRD3* на изменение уровня триглицеридов, одного из компонентов метаболического синдрома, у больных с психическими расстройствами [11].

Грелин представляет собой пептидный гормон из 28 аминокислот, который вырабатывается в основном в желудке. Он является гормональным регулятором и оказывает множество биологических эффектов, наиболее известным из которых является усиление чувства голода [12–14]. Интересно, что грелин также участвует в циркадной регуляции гомеостатического питания [15], а периферически секретируемый гормон участвует в гедонически мотивированной тяге к еде [16]. Ген *GHRH* кодирует белок, который расщепляется с образованием двух пептидов (грелина и обестатина). Грелин секретируется в двух формах: менее 10% ацилируется и связывается с рецептором 1a, стимулирующим секрецию гормона роста (*GHSR1a*). Остаток не ацилируется и реагирует с неизвестным пока рецептором.

Белок, кодируемый геном *FTO* (ассоциированным с жировой массой и ожирением), можно считать одним из важнейших ферментов, удаляющих остатки N6-метиладенозина из молекулы РНК [17, 18]. Хотя ген *FTO* кодирует РНК-деметилазу, вероятно, это не является его основной ролью в возникновении ожирения. Изучена анимальная модель на мышах с дефицитом *FTO*: у мышей наблюдалась постнатальная задержка роста и снижение потребления пищи с уменьшением жировой ткани [19, 20]. В соответствии с этим, сверхэкспрессия *FTO* индуцирует увеличение жировой ткани [21].

В настоящее время существуют различные литературные данные, свидетельствующие об ассоциации полиморфизмов гена рецептора лептина (*LEPR*) с увеличением веса и лекарственно-индуцированным метаболическим синдромом [13, 22, 23]. Кроме того, *LEPR* ранее ассоциировался с увеличением веса и ИМТ (индекс массы тела) у пациентов с психическими расстройствами [24]. Было высказано предположение, что короткая изоформа *LEPRa* отвечает за транспорт лептина через ГЭБ (гематоэнцефалический барьер), а длинная изоформа *LEPRb* является рецептором, ответственным за передачу сигнала в нейронах гипоталамуса [25]. Лептин является одним из основных гормональных сигнализаторов от жировой ткани к другим тканям, включая центральную нервную систему [26]. В основном он продуцируется зрелыми адипоцитами белой жировой ткани на основе экспрессии гена *LEP*. Ранее мы исследовали 4 полиморфизма этого гена и обнаружили, что генотипы и аллели варианта rs3828942 имеют значимую связь с развитием МС [23].

Инсулин-индуцирующий ген (*INSIG2*) кодирует белок из 225 аминокислотных остатков, который играет важную роль в ингибировании синтеза холестерина и других липидов в адипоцитах [27]. *INSIG2* играет важную регулируемую роль в дифференцировке адипоцитов, гомеостазе холестерина, липогенезе и метаболизме глюкозы [28].

Глутатион-S-трансфераза Р (*GSTP*) относится к суперсемейству ферментов, катализирующих реакцию конъюгации восстановленного глутатиона с различными ксенобиотиками, включая канцерогены, антибиотики, нейролептики и продукты окислительного процесса [29, 30]. Имеются данные о том, что дисбаланс между активными формами кислорода и антиоксидантами может быть связан с резистентностью к инсулину как у мышей, так и у людей [31, 32]. Было высказано предположение, что окислительный стресс также может быть связан с патогенезом МС [33]. Таким образом, функциональные полиморфизмы гена *GSTP1* можно рассматривать как потенциальные генетические маркеры фактора риска развития ожирения и антипсихотик-индуцированного МС.

Транспортер Р-гликопротеина (P-gp), кодируемый АТФ-связывающим геном (*ABCB1*), также известным как ген множественной лекарственной устойчивости (*MDR1*), представляет собой трансмембранный белок, экспрессируемый на гематоэнцефалическом барьере. Он транспортирует проникшие химические вещества обратно из головного мозга в кровоток, в связи с чем *ABCB1* часто рассматривается как фармакогенетический маркер ответа на терапию и развития побочных эффектов [34–37].

Несмотря на то что ассоциативных исследований между генетическими полиморфизмами и метаболическим синдромом в литературе достаточно много, отсутствуют работы по изучению экспрессии генов, ассоциированных с развитием ожирения и метаболического синдрома при шизофрении. В связи с этим целью нашего пилотного исследования является оценка экспрессии генов в лейкоцитах периферической крови больных шизофренией с метаболическим синдромом и без него.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 60 больных шизофренией русской национальности, проживающие в регионе Сибири, которые были госпитализированы в клиники НИИ психического здоровья Томского НИМЦ. Основные критерии включения пациентов в исследование: верифицированный диагноз шизофрении (F20 согласно МКБ-10), возраст 18–60 лет, информированное согласие пациента, отсутствие органической патологии и тяжелых соматических нарушений, приводящих к органной недостаточности. Оценивалась

Таблица 1. Демографические и клинические характеристики исследуемой выборки

Параметр	Пациенты без МС (<i>n</i> = 45)	Пациенты с МС (<i>n</i> = 15)	<i>p</i> -value
Возраст, лет (<i>Me</i> [<i>Q1</i> ; <i>Q3</i>])	35 [30.5; 40.5]	43 [33; 49]	0.045*
Пол Мужчины, <i>n</i> , % Женщины, <i>n</i> , %	25 (55.6%) 20 (44.4%)	8 (53.33%) 7 (46.67%)	0.829
Длительность шизофрении, лет (<i>Me</i> [<i>Q1</i> ; <i>Q3</i>])	8 [3; 13.9]	15.89 [9; 21,87]	Менее 0.001*
ХПЭ, мкг (<i>Me</i> [<i>Q1</i> ; <i>Q3</i>])	325.65 [200.05; 520]	451.9 [209.85; 755.75]	Менее 0.085
ИМТ, (<i>Me</i> [<i>Q1</i> ; <i>Q3</i>])	24 [21.73; 28.25]	31.15 [26.69; 35.795]	Менее 0.001*
Обхват талии, см (<i>M</i> ± <i>SD</i>)	85.8 ± 13.085	105.32 ± 11.986	Менее 0.001**

* Значимость различий согласно U-критерию Манна–Уитни.

** Значимость различий согласно *t*-критерию Стьюдента.

Примечание: МС – метаболический синдром; ХПЭ – хлорпромазиновый эквивалент; ИМТ – индекс массы тела; *Me* [*Q1*; *Q3*] – медиана и квартили (первый (верхний) и третий (нижний)); *M* ± *SD* – среднее и стандартное отклонение.

антипсихотическая и сопутствующая терапия, получаемая на момент обследования, а также предшествующая терапия в течение предыдущих шести месяцев. Общая антипсихотическая нагрузка была приведена к единообразию в перерасчете на хлорпромазиновый эквивалент (ХПЭ). Все пациенты принимали антипсихотики второго поколения (рисперидон, оланзапин, кветиапин). Для постановки диагноза МС были выбраны критерии, предложенные Международной Федерацией сахарного диабета (IDF, 2005 г.).

У исследуемых лиц кровь брали утром натощак. Для выделения РНК использовали пробирки RNAgard Blood Tubes с реагентом RNAgard Blood (Biomatrix, США). Определение экспрессии 7 исследуемых генов (*DRD3*, *GHRL*, *FTO*, *LEPR*, *INSIG2*, *GSTP1*, *ABCB1* (*MDR*)) и 3 генов “домашнего хозяйства” (*GAPDH*, *POLR2A*, *RPS200*) проводили с применением технологии QuantiGene Plex 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США). Анализ QuantiGene Plex позволяет проводить мультиплексное измерение экспрессии генов путем комбинирования амплификации сигнала разветвленной ДНК с xMAP-технологией определения нескольких анализов в небольшом количестве образца с использованием флуоресцирующих магнитных частиц. Результирующий сигнал флуоресценции зависит от индивидуальной окраски магнитных микросфер, которую мы детектировали на мультиплексных анализаторах Magpix и Luminex 200 (Luminex, США) (ЦКП “Медицинская геномика”, Томский НИМЦ). Сигнал регистрируется как средняя интенсивность флуоресценции (median fluorescence intensity – MFI) и пропорционален количеству молекул таргетной РНК, присутствующих в образце. Полученные результаты MFI нормализовали

в соответствии с генами “домашнего хозяйства”, принятыми за эталонные. Гены “домашнего хозяйства” (housekeeping genes – HKG) – гены, которые экспрессируются практически во всех тканях и клетках на относительно постоянном уровне и функционируют повсеместно, на всех стадиях жизненного цикла организма. Нормализация проводилась путем вычитания среднего фонового сигнала для каждого гена, деления на среднее геометрическое сигнала, полученного для трех эталонных генов и умножения на 100%.

Статистическую обработку данных проводили с помощью SPSS Statistics (версия 23, для Windows). Данные проверяли на соответствие нормальному закону распределения с помощью критерия Шапиро – Уилка. Для независимых переменных, не соответствующих нормальному распределению, значимость различий определяли с помощью U-критерия Манна – Уитни с расчетом медианы и квартилей (*Me* [*Q1*; *Q3*]). Для данных, соответствующих закону нормального распределения, значимые различия определяли по *t*-критерию Стьюдента с вычислением среднего и стандартного отклонения (*SD*). Тест хи-квадрат был использован для анализа категориальных переменных. Различия считались статистически значимыми при уровне значимости *p* < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Было проведено комплексное клиническое и лабораторное обследование 60 больных параноидной шизофренией, длительно получавших антипсихотическое лечение. Пациенты были разделены на две группы: 45 человек без метаболических нарушений и 15 лиц с МС. В табл. 1 представлены

Таблица 2. Экспрессия генов у больных шизофренией с МС и без него (*Me* [Q1; Q3])

Ген	Пациенты без МС (<i>n</i> = 45)	Пациенты с МС (<i>n</i> = 15)	<i>p</i> -value
DRD3	8.26% [5.755; 13.535]	5.99% [4.15; 22.49]	0.980
GHRL	2.7% [2.145; 3.68]	2.25% [1.91; 2.95]	0.094
FTO	0.39% [0.305; 0.48]	0.43% [0.22; 0.615]	0.677
GSTP1	14.62% [13.08; 18.35]	13.44% [11.18; 18.03]	0.343
LEPR	0.87% [0.54; 1.35]	1.02% [0.75; 1.23]	0.449
INSIG2	1.61% [1.145; 2.19]	1.38% [0.93; 2.1]	0.352
ABCB1	0.52% [0.21; 0.8]	0.5% [0.26; 0.83]	0.806

основные демографические и клинические характеристики исследуемых групп пациентов.

Пациенты с метаболическим синдромом значимо старше, дольше болеют шизофренией и имеют более высокие значения индекса массы тела и окружности талии по сравнению с пациентами без МС.

При оценке экспрессии исследуемых генов у больных шизофренией с МС и без метаболических нарушений не было выявлено значимых различий (табл. 2).

При дальнейшем анализе результатов исследуемая выборка была разделена в зависимости от пола пациентов (табл. 3 и табл. 4).

У больных шизофренией женского пола не было выявлено значимых различий в уровнях экспрессии исследуемых генов, в то время как у пациентов мужского пола наблюдаются значимые изменения.

Мужчины с МС имеют более высокий уровень экспрессии гена *FTO* по сравнению с пациентами мужского пола без МС ($p = 0.041$) (см. табл. 4).

В данном пилотном исследовании была впервые проведена оценка экспрессии 7 генов, потенциально важных для развития метаболического синдрома, в лейкоцитах периферической крови у пациентов с шизофренией, длительно получавших антипсихотические препараты. Лейкоциты представляются доступной, адекватной и перспективной моделью и могут применяться для изучения таких процессов, как развитие метаболических нарушений или, например, процессов

Таблица 3. Экспрессия генов у больных шизофренией женского пола с МС и без него (*Me* [Q1; Q3])

Ген	Женщины без МС (<i>n</i> = 20)	Женщины с МС (<i>n</i> = 7)	<i>p</i> -value
DRD3	10.285% [6.085; 14.56]	4.96% [3.87; 22.49]	0.347
GHRL	3.32% [2.14; 4.015]	2.25% [1.98; 3.41]	0.245
FTO	0.4% [0.35; 0.49]	0.22% [0.14; 0.45]	0.088
GSTP1	15.375% [13.26; 18.82]	15.15% [10.81; 18.18]	0.472
LEPR	0.96% [0.63; 1.415]	0.995% [0.6975; 1.2275]	0.976
INSIG2	1.645% [1.245; 2.09]	1.1% [0.25; 2.17]	0.268
ABCB1	0.46% [0.19; 0.8]	0.495% [0.31; 0.628]	0.968

Таблица 4. Экспрессия генов у больных шизофренией мужского пола с МС и без него (*Me* [Q1; Q3])

Ген	Мужчины без МС (<i>n</i> = 25)	Мужчины с МС (<i>n</i> = 8)	<i>p</i> -value
DRD3	7.83% [5.32; 11.74]	12.745% [4.61; 22.95]	0.355
GHRL	2.7% [2.1; 3.29]	2.165% [1.798; 2.735]	0.153
FTO	0.37% [0.21; 0.48]	0.61% [0.43; 0.64]	0.041*
GSTP1	14.31% [12.275; 17.82]	13.27% [12.44; 17.885]	0.674
LEPR	0.7% [0.49; 1.35]	1.025% [0.735; 1.485]	0.425
INSIG2	1.51% [1.065; 2.29]	1.45% [1.2; 2.09]	0.862
ABCB1	0.545% [0.21; 0.858]	0.5% [0.25; 0.9]	0.725

* Статистически значимые различия согласно U-критерию Манна – Уитни.

иммуновоспаления с возможностью оценки функций значимых в каждом случае экспрессируемых на периферии генов (а не только ассоциаций полиморфизмов). Ген *FTO* связан с жировой массой

и ожирением. Увеличение экспрессии этого гена у пациентов мужского пола с метаболическим синдромом может представлять интерес и иметь значение в развитии метаболического дисбаланса при психических расстройствах.

Ген *FTO* представляет собой относительно недавно обнаруженный ген, связанный с ожирением и экспрессируемый в различных тканях человеческого тела, особенно с высокой экспрессией в головном мозге. *FTO* участвует в ряде биологических процессов, включая не только ожирение, но и функционирование мозга [38]. В частности, недавние исследования показали, что *FTO*, представляющий собой деметилазу N6-метиладенозина (m6A), может влиять на функции мозга посредством модификации m6A мРНК, что демонстрирует потенциальную роль гена *FTO* в шизофрении посредством регуляции модификации m6A генов, связанных с дофамином [39].

Пост-полногеномный функциональный анализ позволил обнаружить общие генетические пути между метаболическими и психическими расстройствами и выявил 86 дифференциально экспрессируемых генов, которые были расположены в разных областях мозга и периферической крови при диабете 2-го типа и психических расстройствах, при этом центральными генами выявленной перекрестной сети являлись гены *FTO* и *TCF7L2* [38].

В наших предыдущих работах мы исследовали связь полиморфизмов генов, связанных с метаболическим синдромом и ожирением [7, 23, 40]. Так, было установлено, что полиморфные варианты (rs9939609, rs1421085, rs3751812, rs8050136) гена *FTO* обнаруживают достоверную ассоциацию с индексом массы тела у 517 больных шизофренией, получавших антипсихотические препараты и тенденции для связи с окружностью талии (отражающей центральное ожирение).

В проведенном нами исследовании была впервые выявлена гендерная специфичность экспрессии гена *FTO* клетками периферической крови у больных шизофренией с метаболическим синдромом. В ряде других исследований, выполненных на пациентах с непсихической патологией, были также продемонстрированы половые различия в носительстве полиморфизмов и экспрессии гена, например, была выявлена ассоциация rs1075440 гена *FTO* с уровнями лептина в плазме у мужчин [41], а также выявлены ассоциации полиморфизмов гена *FTO* с индексом массы тела у мужчин [42].

Ограничениями настоящего исследования является факт, что кровь для оценки экспрессии генов брали в первые дни поступления в клинику, но мы не учитывали влияние предшествующей поддерживающей антипсихотической терапии, которую

пациенты получали на протяжении всей продолжительности болезни, а также комплаентность пациента. Кроме того, группы с и без МС отличаются по возрасту (риск МС повышается с возрастом) и длительности заболевания (вероятность развития МС выше по мере увеличения длительности приема антипсихотических средств). Полученные результаты являются предварительными и нуждаются в дальнейшей проверке в связи с имеющимися ограничениями, наиболее перспективным представляется проспективное исследование пациентов с первым эпизодом, получающих лечение одним и тем же антипсихотическим средством.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пилотные результаты оценки экспрессии генов в периферической крови больных шизофренией позволили выявить более высокий уровень экспрессии гена *FTO*, ассоциированного с жировой массой и ожирением, у пациентов мужского пола с метаболическими нарушениями по сравнению с мужчинами без МС. Необходимо дальнейшее изучение молекулярно-генетических факторов развития МС и механизмов влияния антипсихотиков на метаболические параметры в целях оценки риска метаболических нарушений и реализации персонализированного подхода к терапевтической тактике пациентов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность Медновой Ирине Андреевне за помощь в определении биохимических параметров, необходимых для критериев диагностики метаболического синдрома.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено в рамках государственного задания, тема НИР: “Биопсихосоциальные механизмы патогенеза и клинического полиморфизма, адаптационный потенциал и предикторы эффективности терапии у больных с психическими и поведенческими расстройствами в регионе Сибири”, номер госрегистрации 122020200054-8.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Протокол исследования, согласно которому осуществлялся отбор пациентов, утвержден комитетом по Биомедицинской этике НИИ психического здоровья Томского НИМЦ (№ 101 от 13 июня 2017 г.).

Информированное согласие. Исследование проводилось с учетом этических норм и обязательным

подписанием информированного согласия всех участников. Участники исследования могли в любой момент отказаться от участия по любой причине (согласно Хельсинкской декларации) или быть исключенными при наличии критерий исключений.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sugawara N., Yasui-Furukori N., Sato Y., Umeda T., Kishida I., Yamashita H., Saito M., Furukori H., Nakagami T., Hatakeyama M., Nakaji S., Kaneko S. // *Schizophr. Res.* 2010. V. 123 (2–3). P. 244–250.
2. Lee J., Nurjono M., Wong A., Salim A. // *Ann. Acad. Med. Singap.* 2012. V. 41(10). P. 457–462.
3. Kornetova E.G., Kornetov A.N., Mednova I.A., Goncharova A.A., Gerasimova V.I., Pozhidaev I.V., Boiko A.S., Semke A.V., Loonen A.J.M., Bokhan N.A., Ivanova S.A. // *Front. Psychiatry.* 2021. V. 12. P. 661174.
4. Tian Y., Liu D., Wang D., Wang J., Xu H., Dai Q., Andriescue E.C., Wu H.E., Xiu M., Chen D., Wang L., Chen Y., Yang R., Wu A., Wei C.W., Zhang X. // *Schizophr. Res.* 2020. V. 215. P. 270–276.
5. Sugai T., Suzuki Y., Yamazaki M., Shimoda K., Mori T., Ozeki Y., Matsuda H., Sugawara N., Yasui-Furukori N., Minami Y., Okamoto K., Sagae T., Someya T. // *PLoS One.* 2016. V. 11(11). e0166429.
6. Sneller M.H., de Boer N., Everaars S., Schuurmans M., Guloksuz S., Cahn W., Luyckx J.J. // *Front. Psychiatry.* 2021. V. 12. P. 625935.
7. Boiko A.S., Mednova I.A., Kornetova E.G., Goncharova A.A., Semke A.V., Bokhan N.A., Ivanova S.A. // *J. Pers. Med.* 2022. V. 12. P. 1655.
8. Pinto J.A.F., Freitas P.H.B., Nunes F.D.D., Granjeiro P.A., Santos L.L.D., Machado R.M. // *Rev. Lat. Am. Enfermagem.* 2018. V. 26. e2983.
9. Kegeles L.S., Abi-Dargham A., Frankle W.G., Gil R., Cooper T.B., Slifstein M. // *Arch. Gen. Psychiatry.* 2010. V. 67(3). P. 231–239.
10. Paderina D.Z., Boiko A.S., Pozhidaev I.V., Bocharova A.V., Mednova I.A., Fedorenko O.Y., Kornetova E.G., Loonen A.J.M., Semke A.V., Bokhan N.A., Ivanova S.A. // *J. Pers. Med.* 2021. V. 11(3). P. 181.
11. Chang T.T., Chen S.L., Chang Y.H., Chen P.S., Chu C.H., Chen S.H., Huang S.Y., Tzeng N.S., Wang L.J., Wang T.Y., Li C.L., Chung Y.L., Hsieh T.H., Lee I.H., Chen K.C., Yang Y.K., Hong J.S., Lu R.B., Lee S.Y. // *Medicine (Baltimore).* 2016. V. 95(24). e3488.
12. Lee J.H., Cho J. // *Sleep Med. Clin.* 2022. V. 17. P. 111–116.
13. Jin H., Meyer J.M., Mudaliar S., Jeste D.V. // *Schizophr. Res.* 2008. V. 100. P. 70–85.
14. Goetz R.L., Miller B.J. // *Schizophr. Res.* 2019. V. 206. P. 21–26.
15. Koop S., Oster H. // *The FEBS Journal.* 2022. V. 289. P. 6543–6558.
16. Davis J. // *Brain Research.* 2018. V. 1693 (B). P. 154–158.
17. Zhou Y., Kong Y., Fan W., Tao T., Xiao Q., Li N., Zhu X. // *Biomed. Pharmacother.* 2020. V. 131. P. 110731.
18. He P.C., He C. // *EMBO J.* 2021. V. 40(3). e105977.
19. Fischer J., Koch L., Emmerling C., Vierkotten J., Peters T., Brüning J.C., Rütther U. // *Nature.* 2009. V. 458(7240). P. 894–898.
20. Gao X., Shin Y.H., Li M., Wang F., Tong Q., Zhang P. // *PLoS One.* 2010. V. 5(11). e14005.
21. Church C., Moir L., McMurray F., Girard C., Banks G.T., Teboul L., Wells S., Brüning J.C., Nolan P.M., Ashcroft F.M., Cox R.D. // *Nat. Genet.* 2010. V. 42(12). P. 1086–1092.
22. Vasudev K., Choi Y.H., Norman R., Kim R.B., Schwarz U.I. // *Can. J. Psychiatry.* 2017. V. 62(2). P. 138–149.
23. Boiko A.S., Pozhidaev I.V., Paderina D.Z., Mednova I.A., Goncharova A.A., Fedorenko O.Y., Kornetova E.G., Semke A.V., Bokhan N.A., Loonen A.J.M., Ivanova S.A. // *Genes.* 2022. V. 13. P. 844.
24. Gregoor J.G., van der Weide J., Mulder H., Cohen D., van Megen H.J., Egberts A.C., Heerdink E.R. // *J. Clin. Psychopharmacol.* 2009. V. 29(1). P. 21–25.
25. Banks W.A. // *Compr. Physiol.* 2021. V. 11(4). P. 2351–2369.
26. Wada N., Hirako S., Takenoya F., Kageyama H., Okabe M., Shioda S. // *J. Chem. Neuroanat.* 2014. V. 61–62. P. 191–199.
27. Yan R., Cao P., Song W., Li Y., Wang T., Qian H., Yan C., Yan N. // *Cell Rep.* 2021. V. 35. P. 109299.
28. Dong X.Y., Tang S.Q. // *Peptides.* 2010. V. 31. P. 2145–2150.
29. Hayes J.D., Strange R.C. // *Pharmacology.* 2000. V. 61. P. 154–166.
30. Park Y.M., Lee H.J., Kang S.G., Choi J.E., Cho J.H., Kim L. // *Psychiatry Investig.* 2010. V. 7(2). P. 147–152.
31. Fridlyand L.E., Philipson L.H. // *Diabetes Obes. Metab.* 2006. V. 8. P. 136–145.
32. Houstis N., Rosen E.D., Lander E.S. // *Nature.* 2006. V. 440. P. 944–948.
33. Lee Y.S., Kim A.Y., Choi J.W., Kim M., Yasue S., Son H.J., Masuzaki H., Park K.S., Kim J.B. // *Mol. Endocrinol.* 2008. V. 22. P. 2176–2189.
34. Marzolini C., Paus E., Buclin T., Kim R.B. // *Clin. Pharmacol. Ther.* 2004. V. 75(1). P. 13–33.
35. Macdonald N., Gledhill A. // *Arch. Toxicol.* 2007. V. 81(8). P. 553–563.
36. Geers L.M., Pozhidaev I.V., Ivanova S.A., Freidin M.B., Schmidt A.F., Cohen D., Boiko A.S.,

- Paderina D.Z., Fedorenko O.Y., Semke A.V., Bokhan N.A., Wilffert B., Kosterink J.G.W., Touw D.J., Loonen A.J.M.* // *Br.J. Clin. Pharmacol.* 2020. V. 86(9). P. 1827–1835.
37. *Geers L.M., Ochi T., Vyalova N.M., Losenkov I.S., Paderina D.Z., Pozhidaev I.V., Simutkin G.G., Bokhan N.A., Wilffert B., Touw D.J., Loonen A.J.M., Ivanova S.A.* // *Hum. Psychopharmacol.* 2022. V. 37(3). e2826.
38. *Ding H., Xie M., Wang J., Ouyang M., Huang Y., Yuan F., Jia Y., Zhang X., Liu N., Zhang N.* // *J. Psychiatr. Res.* 2023. V. 159. P. 185–195.
39. *Chang R., Huang Z., Zhao S., Zou J., Li Y., Tan S.* // *Biomed. Res. Int.* 2022. V. 2022. P. 2677312.
40. *Boiko A.S., Pozhidaev I.V., Paderina D.Z., Bocharova A.V., Mednova I.A., Fedorenko O.Y., Kornetova E.G., Loonen A.J.M., Semke A.V., Bokhan N.A., Ivanova S.A.* // *Pharmgenomics. Pers. Med.* 2021. V. 14. P. 1123–1131.
41. *Ortega-Azorín C., Coltell O., Asensio E.M., Sorlí J.V., González J.I., Portolés O., Saiz C., Estruch R., Ramírez-Sabio J.B., Pérez-Fidalgo A., Ordovas J.M., Corella D.* // *Nutrients.* 2019. V. 11(11). P. 2751.
42. *Pirastu N., Cordioli M., Nandakumar P., Mignogna G., Abdellaoui A., Hollis B., Kanai M., Rajagopal V.M., Parolo P.D.B., Baya N., Carey C.E., Karjalainen J., Als T.D., Van der Zee M.D., Day F.R., Ong K.K., FinnGen Study, 23andMe Research Team, iPSYCH Consortium, Morisaki T., de Geus E., Bellocco R., Okada Y., Børglum A.D., Joshi P., Auton A., Hinds D., Neale B.M., Walters R.K., Nivard M.G., Perry J.R.B., Ganna A.* // *Nat Genet.* 2021. V. 53(5). P. 663–671.

Pilot Study of the *DRD3*, *GHRL*, *FTO*, *LEPR*, *INSIG2*, *GSTP1*, *ABCB1* Genes Expression in Peripheral Blood Leukocytes in Schizophrenic Patients with Metabolic Syndrome

A. S. Boiko¹, D. Z. Paderina¹, E. V. Mikhailitskaya¹, E. G. Kornetova^{1,2}, N. A. Bokhan^{1,3}, and S. A. Ivanova^{1,2}

¹*Mental Health Research Institute, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russia*

²*Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education “Siberian State Medical University” of the Ministry of Health of the Russian Federation, Tomsk, Russia*

³*National Research Tomsk State University, Tomsk, Russia*

Many individuals with schizophrenia also suffer from metabolic syndrome (MetS), which is a major risk factor for the development of cardiovascular diseases associated with a heavy burden of disease, as well as with premature death of patients. This study investigated the expression of 7 genes potentially important for the development of metabolic syndrome. QuantiGene Plex 2.0 technology was used to measure how 7 studied genes (*DRD3*, *GHRL*, *FTO*, *LEPR*, *INSIG2*, *GSTP1*, *ABCB1* (*MDR1*)) were expressed by leukocytes in 60 recently admitted patients with schizophrenia who had been on treatment with antipsychotic drugs. The preliminary results of our study show a change in the expression of the *FTO* gene in schizophrenia male with metabolic disorders, however, further studies are needed to determine the role of disturbances in the expression of this gene in the development of the metabolic syndrome in patients with schizophrenia.

Keywords: schizophrenia, metabolic syndrome, gene expression, DRD3, GHRL, FTO, LEPR, INSIG2, GSTP1, ABCB1

УДК 57.042

СТРЕССОРНЫЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ И КОГНИТИВНАЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ: ПОИСК МИШЕНЕЙ И ОБЩИХ МЕХАНИЗМОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУТАНТОВ ДРОЗОФИЛЫ

© 2024 г. Д. М. Каровецкая^{1,2}, А. В. Медведева², Е. В. Токмачева², С. А. Васильева^{1,2},
А. В. Реброва¹, Е. А. Никитина^{1,2,*}, Б. Ф. Щеголев², Е. В. Савватеева-Попова²

¹Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена, Санкт-Петербург, Россия

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

*E-mail: 21074@mail.ru

Поступила в редакцию 11.04.2023 г.

После доработки 29.07.2023 г.

Принята к публикации 30.07.2023 г.

По современным представлениям биохимические каскады, активируемые в ответ на стрессорное воздействие, вносят вклад и в когнитивные функции — обучение и формирование памяти. Рассматривая условный рефлекс как адаптацию к внешней среде, можно предположить его возникновение как реакцию на внешние вызовы, которые при подкреплении способствуют формированию условной связи, а при отсутствии вызывают развитие стрессорной реакции. Метаболическая активность организма неразрывно связана с циркадными ритмами, которые определяют суточные колебания освещенности, температуры, содержания кислорода и магнитного поля. Интеграция перечисленных таймеров осуществляется белком семейства криптохромов (CRY), выполняющим функции рецептора голубого света и известного как репрессор главного циркадного транскрипционного комплекса CLOCK/BMAL1. В целях разработки способов неинвазивной коррекции патологий нервной системы на модельном объекте генетики — дрозофиле с использованием мутантных линий изучается взаимосвязь адаптивных механизмов формирования условной связи и развития стрессорной реакции на ослабление магнитного поля, гипоксическое и температурное воздействие. Данные обсуждаются в свете роли системы CRY/CLOCK/BMAL1 как связующего звена магнитоцепции, гипоксии, регуляции циркадного ритма, когнитивных функций и двухпочечных разрывов ДНК в нервных ганглиях (показателя физиологической активности нейронов).

Ключевые слова: обучение, память, криптохромы, магнитное поле, гипоксия, температурное воздействие

DOI: 10.31857/S1027813324010065, EDN: GZALWO

ВВЕДЕНИЕ

Недооцененным вкладом в учение И. П. Павлова об условных рефлексах является открытие М. Е. Лобашевым и В. Б. Савватеевым роли условного рефлекса в преодолении стрессорирующих воздействий. Пищевое подкрепление экстремальных стимулов — высокой температуры воды при содержании гидры, воздействие сильным (трещотка — 92 дБ) и сверхсильным звуковым генератором (частота — 800–850 Гц, сила звука — 107 дБ), а также подкормка в темную фазу суток дневных птиц (куриц) позволила организмам адаптироваться к несвойственной среде обитания. При этом авторы отмечали, что формированию условной связи сопутствовало улучшение функционирования нервной системы, способности к выработке

условных рефлексов и другие “глубокие изменения в функциональных свойствах нервных клеток головного мозга” [1]. По-видимому, существует единый адаптационный механизм, лежащий в основе формирования стрессорной реакции и обучения, который позволяет с привлечением факторов, влияющих на тысячи генов-мишеней (например, некодирующие РНК), приспособиться к окружающей среде обитания. В настоящее время это положение подтверждается экспериментально. Согласно данным О. Г. Зацепиной с соавторами, в разных парадигмах обучения, будь то наказание или вознаграждение, используются механизмы реакции на стресс [2].

Адаптивные механизмы включаются с первых минут жизни организма, из них наиболее древние и консервативные должны определять реакцию на

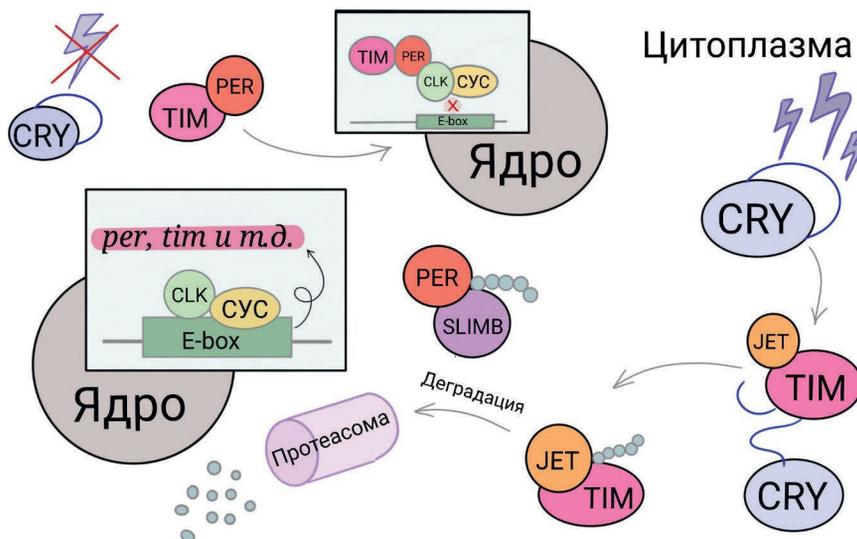


Рис. 1. Роль CRY в переключении молекулярных часов. Стрелки отражают влияние на процессы, описание которых изложено в тексте (адаптировано по Damulewicz, Mazzotta, 2020).

смену дня и ночи, освещение, температуру, давление, геомагнитную составляющую. Поиск общих механизмов, связывающих когнитивные функции и реакцию на стрессорное воздействие, приводит к пониманию значимости одной из основополагающих систем, затрагивающих все стороны функционирования организма – механизма формирования суточных ритмов. Одним из важнейших регуляторов этой системы являются криптохромы (CRY). Роль криптохромов в циркадных часах различна – у растений они являются сенсорами голубого света, у млекопитающих теряют светочувствительность, но в обоих случаях осуществляют функции репрессоров транскрипции генов циркадного ритма [3]. По-видимому, именно криптохромы являются наиболее древним сенсором, осуществляющим регуляцию внутренних часов животного и растительного мира.

У дрозофилы фоторецептор CRY, связываясь с белком TIMELESS (TIM) и разрушая его, синхронизирует метаболические петли обратной связи с циклами свет/темнота (рис. 1) [4, 5]. Активация экспрессии генов *per*, *tim* и других генов суточного ритма осуществляется с помощью белков CLOCK (CLK) и CYCLE (CYC) в вечернее время суток. Белки PER и TIM накапливаются в цитоплазме, а поздно ночью димеризуются и транслоцируются в ядро, где связываются с CLK/CYC и ингибируют их активность, тем самым подавляя транскрипцию собственных генов. В световую фазу CRY связывает TIM и способствует его деградации через протеасому по механизму, который включает белок F-box JETLAG (JET) [3].

Значение CRY многократно усиливается благодаря участию в посттранскрипционной регуляции

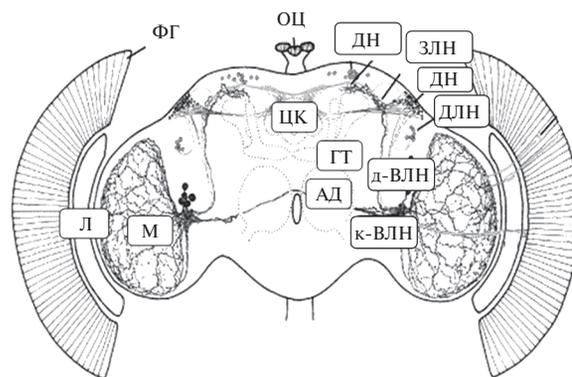


Рис. 2. Система циркадных осцилляторных нейронов мозга дрозофилы: АД – антеннальные доли; ФГ – фасеточные глаза; Л – ламина; М – медула; ГТ – грибовидное тело; ЦК – центральный комплекс; ОЦ – оцеллы; к-ВЛН – короткие вентро-латеральные нейроны; д-ВЛН – длинные вентро-латеральные нейроны; ДЛН – дорзо-латеральные нейроны; ДН – дорсальные нейроны; ЗЛН – задне-латеральные нейроны (адаптировано по Helfrich-Förster, 2005).

за счет взаимодействия с BELLE-DEAD-box RNA геликазой, которая играет важную роль в метаболизме РНК, начиная со сплайсинга до созревания miРНК и siРНК [3, 6].

Система регуляции суточных ритмов дрозофилы состоит из 150 нейронов, дорсальных (ДН) и латеральных (ЛН) нейронов, разделенных на группы задне-латеральных (ЗЛН), вентро-латеральных (ВЛН) и дорзо-латеральных нейронов (ДЛН) (рис. 2) [3, 7]. Вентро-латеральные нейроны

классифицируют в зависимости от их относительного размера на малые и большие (м-ВЛН и б-ВЛН соответственно) [8]. м-ВЛН и б-ВЛН экспрессируют пигмент-дисперсионный фактор (PDF), нейропептид, участвующий в межклеточной коммуникации между нейронами циркадного ритма [9].

Криптохромы экспрессируются в системе вентро-латеральных к-ВЛН и д-ВЛН, дорзо-латеральных и дорзальных. При этом д-ВЛН имеют прямые синаптические контакты с дофаминовыми нейронами. Дофамин, как известно, играет ключевую роль в регуляции локомоции, половом поведении, обучении и памяти дрозофилы [10, 11]. Активированный CRY деполаризует мембрану, связываясь с редокс-чувствительной β -субъединицей (hyperkinetic) потенциал-зависимого $K(+)$ канала [3]. Нейроны суточного ритма контролируют функции грибовидного, веерообразного и эллипсоидного тел мозга дрозофилы, регулируя сон, во время которого, предположительно, происходит консолидация памяти [12–15]. На существование связи циркадных ритмов и формирования памятного следа указывают данные о неспособности мутантов по гену *per* к формированию долгосрочной памяти [16]. Обладающие фотолиазной активностью криптохромы класса DASH (*Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis* и *Homo*) участвуют в репарации одноцепочечных разрывов ДНК [17]. Вместе с тем CRY подавляет гомологичную рекомбинацию при репарации двухцепочечных разрывов ДНК (ДЦР) в ночное время [18]. ДЦР играют не

последнюю роль в экспрессии ранних генов (*cFos* и *FosB*), обучении и формировании памятного следа [19].

Интересно, и, по всей видимости, неслучайно, что CRY опосредует реакцию на каждое из вышеперечисленных экологически значимых воздействий. Недаром исследованиям CRY посвящена статья под названием One actor, multiple roles: the performances of cryptochrome in *Drosophila* [3]. В связи с этим важно рассмотреть, посредством каких мишеней происходит восприятие стрессорных воздействий (с использованием мутантов дрозофилы с известным биохимическим проявлением) и какова их роль в формировании поведенческих реакций (обучении и памяти), а также в целостности генетического аппарата.

ГЕОМАГНИТНОЕ ПОЛЕ

С суточными ритмами неразрывно связано геомагнитное поле. Суточные вариации геомагнитного поля возникают регулярно в основном за счет токов в ионосфере Земли, вызванных изменениями освещенности земной ионосферы Солнцем в течение суток. Низкочастотное электромагнитное поле демонстрирует ярко выраженные 24-часовые колебания и, следовательно, может действовать как геофизический синхронизатор для циркадных часов [3]. Именно флавопротеин CRY является магнитосенсором, пики спектра действия которого находятся в диапазоне УФ-А (350–400 нм) с плато в ближнем синем диапазоне (430–450 нм) [5].

Механизм магниторецепции до сих пор остается непознанным, однако на сегодняшний день существует две гипотезы, ключевыми звеньями которых выступают криптохромы и магнетиты. Криптохромы считаются определяющими для светозависимой способности дрозофилы чувствовать магнитные поля [20].

Биологическая магниторецепция основана на влиянии магнитного поля на спиновую динамику радикальных пар репрессора транскрипции CRY. Незначительные изменения в спиновой динамике, индуцированные слабым магнитным полем (переход из синглетного состояния в триплетное), могут заметно повлиять на ход реакции (рис. 3) [21–23].

CRY, будучи репрессором главного циркадного транскрипционного комплекса CLOCK/BMAL1, который контролирует экспрессию сотен генов, включая гены-регуляторы циркадного ритма — *PER* и *TIM*, способствует адаптации живых организмов к изменяющимся условиям окружающей среды [24].

Магнитное поле влияет на поведение дрозофилы [25]. При освещении полного спектра

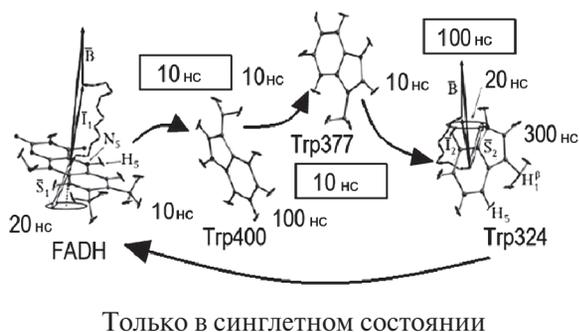


Рис. 3. Схема влияния магнитного поля на радикальные пары, формирующиеся между FADH (восстановленный флавинадениндуклеотид) и триптофаном в активном сайте молекулы CRY: S_1 и S_2 — неспаренные электронные спины, которые прецессируют в локальном магнитном поле, образованном наложением внешнего магнитного поля на собственные магнитные поля I_1 и I_2 ядерных спинов. Обратный перенос электронов от триптофана на FADH гасит активное состояние криптохрома при условии нахождения электронных спинов в синглетном состоянии (адаптировано по Solov'yov, Schulten, 2009).

в поведенческом анализе магниточувствительности мухи демонстрировали избегание магнитного поля, но не реагировали, когда УФ-А/синий свет (менее 420 нм) блокировался. У *cry* мутантов наблюдалась аналогичная картина, что указывает на вовлечение CRY в светозависимое магнитное восприятие у *Drosophila*. Приложение электромагнитного поля вызывало удлинение циркадного периода двигательной активности, и этот эффект был сильнее, когда мухи подвергались постоянному воздействию синего света, что, вероятно, является результатом усиления функций CRY [3].

В лаборатории нейрогенетики Института физиологии им. И. П. Павлова РАН для выявления внутриклеточных мишеней действия магнитного поля Земли было предпринято изучение влияния ослабленного статического магнитного поля (ОСМП) в камере из магнитомягкого сплава АМАГ172, ослабляющей магнитное поле Земли в 35 раз с привлечением различных линий дрозофилы [26]. В эксперименте использовали мутантную линию дрозофилы *agn^{ts3}* (ЦКП “Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем”), которая характеризуется мутационным повреждением гена *CG1848 LIM*-киназы 1 [27]. LIMK1 – важнейший фактор сигнальной трансдукции, фосфорилирует фактор деполимеризации актина – кофилин; ремоделирование актинового цитоскелета определяет синаптическую пластичность нервной системы, облегчая кластеризацию и интернализацию рецепторов и регулируя плотность и морфологию шипиков дендритов [28]. Кроме того, актин непосредственно взаимодействует с комплексами ремоделирования хромосом, транскрипционными факторами и РНК-полимеразами, регулируя транскрипционный выход клетки [29]. Способность к обучению и формированию среднесрочной памяти самцов оценивали в парадигме условно-рефлекторного подавления ухаживания [30]. Мутация *agn^{ts3}* нарушает обучение и память при перmissive температуре, однако воздействие ОСМП восстанавливает когнитивные функции *agn^{ts3}* в отличие от контрольной линии дикого типа *CS*, у которой нарушается формирование 3-часовой памяти. Изучение реципрокных гибридов показало наследование отцовского паттерна поведения и реакции на стрессорное воздействие не только когнитивных функций, но и целостности хромосомного аппарата (частота ДЦР, уровня хроматидных мостов в анафазе нейробластов личинок) [31]. Эти данные свидетельствуют как о роли динамики актинового цитоскелета в качестве мишени ОСМП, так и об участии транс-генерационных факторов, в частности мир-РНК, обеспечивающих патроклинную реакцию на стрессорное воздействие. Интересно, что 6 мир-РНК, профиль которых изменен у мутанта

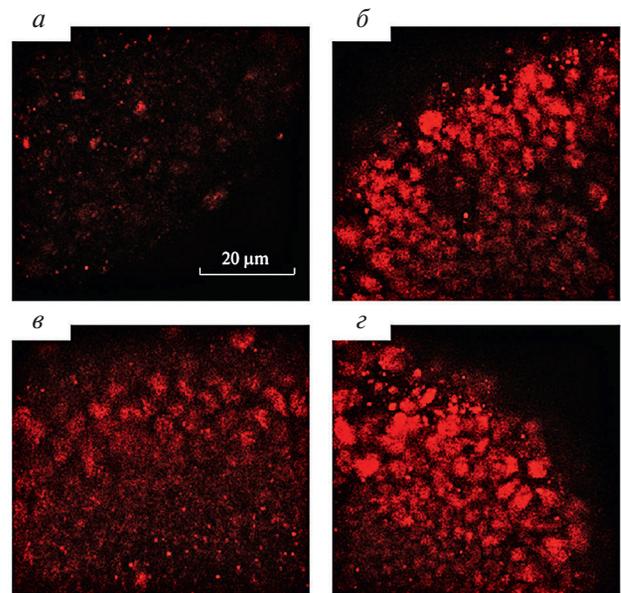


Рис. 4. Иммунохимический анализ ДЦР в нервных ганглиях личинок дрозофилы с помощью антител к Ser137-фосфо-H2Av: *а* – ядра DopLIMK- (подавление гена *limk1* в дофаминовых нейронах) в н.у.; *б* – ядра DopLIMK- после воздействия ОСМП; *в* – ядра DopLIMK + (ген *limk1* функционирует); *г* – ядра DopLIMK + после воздействия ОСМП (по Медведева и др., 2022).

с аритмическим суточным ритмом *suc⁰¹* (miR-263a, miR-133, miR-124, miR-184, miR-210, miR-276b), также достоверно отличается у *agn^{ts3}* от уровня ряда линий дикого типа [32, 33]. При этом в отношении транс-генерационного наследования наиболее интересна miR-124, которая экспрессируется в раннем развитии (0–12 ч) и регулирует синаптическую трансмиссию, морфогенез дендритов, дифференцировку нервной системы [34], участвует в регуляции полового поведения самцов за счет контроля синтеза соответствующих феромонов [35]. Подобную функцию может исполнять и *let-7*, содержание которой снижено у *agn^{ts3}*. *Let-7* экспрессируется в семенниках, участвует в формировании нервной системы и регулирует циркадные ритмы [36].

Было проведено изучение роли LIMK1, в частности, подавления трансляции с помощью РНК-интерференции с использованием бинарного конструкта Gal4-UAS, в отдельных – дофаминовых и серотониновых – нейронах в формировании стрессорной реакции на ОСМП [37]. Известно значение серотонин-дофаминовой оси в формировании долгосрочной памяти. Важную роль в данном процессе играет дофамин – медиатор системы внутреннего вознаграждения у млекопитающих и насекомых [38]. Дофаминергические нейроны также играют ключевую роль

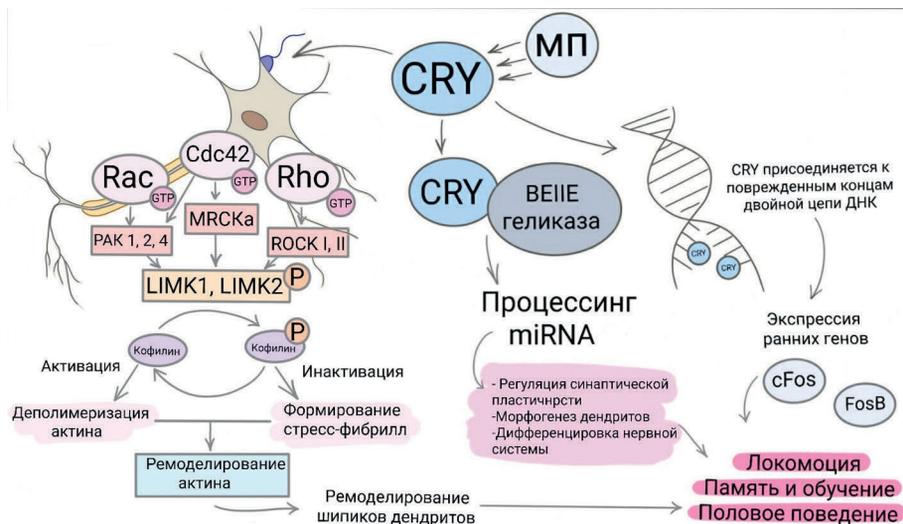


Рис. 5. Гипотетическая схема влияния магнитного поля через магнитосенсор CRY. Стрелки отражают влияние на процессы, описание которых изложено в тексте.

в механизмах активного забывания [39]. Взаимодействие этих нейронных систем влияет на локомоторную активность [40]. Матричные процессы в нейронах сопровождаются ДЦР. Предполагается, что ДЦР при ремоделировании хроматина необходимы для экспрессии генов, вовлеченных в процессы формирования памяти и обучения [41]. Нарушения митоза в результате ДЦР создают основу соматического мозаицизма нейронов, по-видимому, имеющего важное функциональное значение [42]. Анализ иммуногистохимических данных (фокальные срезы анализировали в ЦКП “Конфокальная микроскопия” Института физиологии им. И. П. Павлова РАН на лазерном сканирующем микроскопе LSM 710 Carl Zeiss) показал наличие межлинейных различий по частоте ДЦР и увеличение уровня ДЦР после ОСМП (рис. 4). Известно, что гены циркадного ритма – магнитосенсоры *cryptochrome* (*CRY1* и *CRY2*), а также *period* (*PER1*, *PER2*, *PER3*) и *timeless* (*TIM*) вовлечены в узнавание и репарацию повреждений ДНК [43]. При этом дисфункция системы Tim-Tirip приводит к увеличению уровня фосфорилирования гистона H2AX и частоты ДЦР [44].

Оказалось, что низкий уровень LIMK1 способствует обучению в парадигме условно-рефлекторного подавления ухаживания, но не формированию среднесрочной памяти. В то же время у линии с повышенным содержанием LIMK1 стрессорное воздействие восстанавливает способность к обучению и формированию памяти [37]. Таким образом, уровень LIMK1 дофамин- и серотонинергических нейронов значим для стрессорного ответа как на геномном, так и на поведенческом уровнях. В работе Карки с соавторами

показано, что CRY-зависимые от магнитного поля эффекты проявляются в спайковой активности нейронов, локомоторной активности и поведении в Т-образных лабиринтах [5]. Каждый из вышеперечисленных феноменов вносит вклад в условно-рефлекторное подавление ухаживания. Полученные нами данные свидетельствуют о важной роли дофаминовых и серотониновых нейронов в рецепции магнитных и световых воздействий посредством ремоделирования актинового цитоскелета и изменения паттерна ДЦР. По материалам литературных и собственных данных можно предложить следующую гипотетическую схему влияния на организм магнитного поля через магнитосенсор CRY (рис. 5).

ГИПОКСИЯ

Циркадные часы тесно связаны с гипоксическим сигнальным путем. Суточная осцилляция гликолитических метаболитов, а также циркадные колебания соотношений основных клеточных окислительно-восстановительных элементов НАД⁺/НАДН и НАДФ⁺/НАДФН нарушаются при гипоксии. Существует двунаправленная связь на молекулярном, физиологическом и организменном уровне [45]. Известно, что промотор ключевого транскрипционного регулятора адаптации к кислородному голоданию – HIF1 содержит регуляторный мотив для генов контроля суточного ритма [46]. При этом HIF1 непосредственно связывается с промоторами ключевых циркадных генов [47]. CRY, контролирующий циркадные ритмы через гетеродимер CLOCK/BMAL1 (гомологичен CLK/CYC дрозофилы), ограничивает

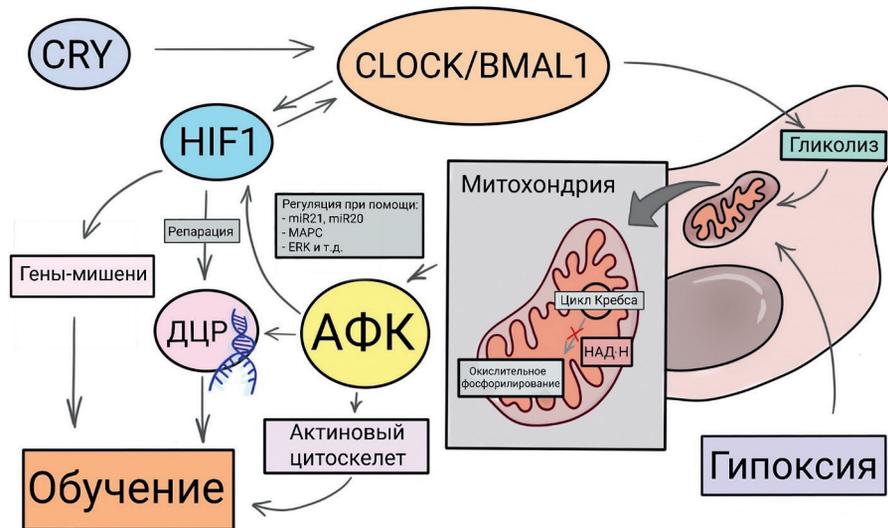


Рис. 6. Схематичное изображение взаимодействия систем циркадного ритма и стрессорного ответа на гипоксию: АФК — активные формы кислорода, ДЦР — двухцепочечные разрывы. Стрелки отражают влияние на процессы, описание которых изложено в тексте.

транскрипцию чувствительных к гипоксии генов посредством репрессии гетеродимеров HIF1 α -BMAL1 [48].

В контексте общих механизмов адаптивных реакций значимым является протекторный эффект магнитного поля при гипоксии и развитии оксидативного стресса [49]. В связи с взаимодействием этих систем генов возможен и общий механизм воздействия магнитного поля и гипоксии на когнитивные функции и хромосомный аппарат. В условиях гипоксии наблюдается усиление продукции активных форм кислорода [50]. В первые мгновения гипоксии комплекс I электронно-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий претерпевает конформационные изменения, теряет способность транспортировать H⁺ в межмембранное пространство, способствуя закислению митохондриального матрикса. При этом фосфат кальция в матриксе частично растворяется, высвобождая ионы Ca²⁺, что приводит к активации Ca²⁺/Na⁺ обменника и входу Na⁺ в митохондрию. Взаимодействие Na⁺ с карбонильной группой фосфолипидов с формированием агрегатов увеличивает вязкость внутренней мембраны митохондрий, это затрудняет образование функциональных суперкомплексов ЭТЦ. Отсутствие O₂ в качестве терминального окислителя, а также дисфункция комплексов ЭТЦ приводит к обратному переносу электронов и гиперпродукции активных форм кислорода (АФК) [50]. Относительно экранирования магнитного поля известно, что ОСМП влияет на функционирование митохондрий, это ведет к гиперпродукции АФК [51].

Будучи производными митохондриального дыхания, в нормальных условиях АФК являются

сигнальными молекулами, однако при гиперпродукции оказывают повреждающее действие на клеточные органеллы и, в частности, на ДНК, вызывая образование ДЦР [52]. Известно, что для нервных клеток характерен высокий уровень повреждения ДНК из-за интенсивных свободно-радикальных процессов в мозге, что может иметь как негативные, так и позитивные последствия. Недавние исследования выявили высокие уровни “запрограммированных” разрывов ДНК в нейронах, которые, вероятно, возникают во время физиологических метаболических процессов ДНК, присущих развитию, дифференцировке, поддержанию нейронов и, что важно, эпигенетической регуляции [53]. В связи с этим была предпринята попытка изучения характера перестроек хромосом в нервных ганглиях личинок, вызванных гипоксией. Оказалось, что у дрозофилы увеличивается профиль мостов после 30 мин гипоксии, 15 мин из которых — с 3%-ным уровнем кислорода. Мосты являются следствием негомологичной репарации ДЦР и изохроматидных разрывов при асимметричных хроматидных транслокациях. Для линии *agn^{ts3}* в норме характерна высокая частота перестроек и мостов по сравнению с контролем. По-видимому, предпочтительный способ репарации повреждений путем слияния негомологичных концов разрывов и неаллельное гомологичное спаривание является следствием измененной динамики ремоделирования актина у *agn^{ts3}*. Известно, что актиновые филаменты участвуют в кластеризации поврежденных участков ДНК и, соответственно, в репарации ДЦР [54]. При гипоксическом воздействии наблюдается двукратное

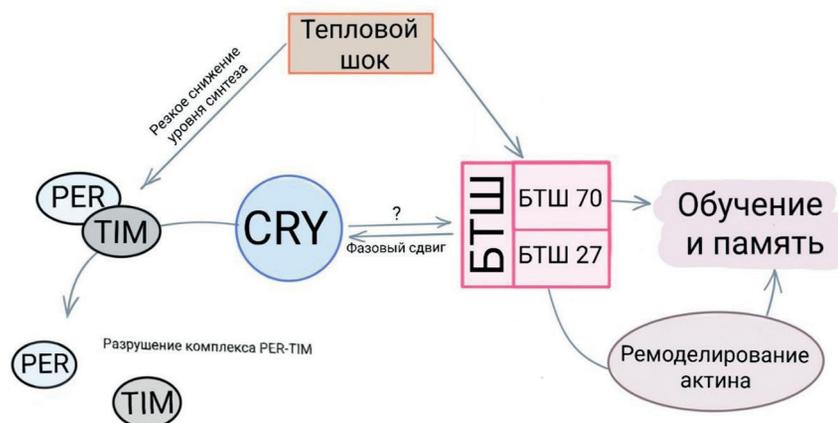


Рис. 7. Схема взаимосвязи системы циркадных ритмов и стрессорного ответа на температурный шок. БТШ – белки теплового шока. Стрелки отражают влияние на процессы, описание которых изложено в тексте.

увеличение профиля отставших хромосом у *agn^{ts3}* по сравнению с контрольной линией. Отставание хромосом происходит не только при нарушении аппарата клеточного деления, но и при симметричном межхроматидном обмене. Таким образом, связь суточных ритмов с содержанием кислорода опосредуется у дрозофилы динамикой актинового цитоскелета и формированием ДЦР, что сказывается на когнитивных функциях. По-видимому, это объясняется тем, что окислительно-восстановительная регуляция является одним из основных модуляторов актинового цитоскелета и связанных с ним белков [55]. Согласно нашим исследованиям, при обучении мух в условиях гипоксии способность к обучению, но не среднесрочной памяти, достоверно выше по сравнению с обученными до или после гипоксического воздействия [56]. Это может быть обусловлено ролью HIF1, его экспрессия регулируется в том числе избытком АФК. HIF1 не только участвует в репарации ДНК, но и стимулирует транскрипцию генов, являющихся нейропротекторами нервной системы (*VEGF, EPO, HO-1, ADM, Glut-1*) [57–59]. На рис. 6 представлена схема взаимовлияния систем циркадного ритма и стрессорного ответа на гипоксическое воздействие.

ТЕМПЕРАТУРА

Будучи пойкилотермным организмом, дрозофила зависит от колебания температуры и в соответствии с температурным воздействием регулирует свое поведение, избегая повышенных и пониженных режимов [60]. В природе дневной цикл свет/темнота и флуктуация температуры используются организмом для синхронизации внутренних часов суточного ритма и являются своеобразными

таймерами. Циркадные часы дрозофилы могут быть легко синхронизированы с помощью температурных циклов с амплитудой 2–3°C, а различные подмножества нейронов циркадного ритма специфически участвуют в обеспечении синхронизации часов при высоких (дорзальные) или низких температурах (задне-латеральные) [61]. Температурные циклы значительно влияют на уровень TIM в CRY-негативных нейронах [62]. CRY гасит индуцированные температурой колебания PER в дорзальных нейронах [61], и в соответствии с этим отсутствие CRY в нейронах суточного ритма увеличивает способность мух синхронизироваться с температурными циклами. Таким образом, CRY играет важную роль в противодействии влиянию температурных циклов на молекулярные циркадные часы, тем самым способствуя интеграции таймеров [3]. Нефизиологические температуры (около 37°C) вызывают сбой функционирования внутриклеточных часов. Если для растений доказана роль CRY в регуляции генов теплового шока [63], то значение CRY в реакции на тепловой шок животного царства находится на стадии пристального изучения. Показано, что тепловой шок вызывает резкое снижение уровня белков PER и TIM. Выдвигается предположение о роли CRY в индуцированном температурой разрушении комплекса PER – TIM [60]. Изучаются метаболические пути, которые связывают температуру с циркадными ритмами дрозофилы. Нокдаун пути теплового шока влияет на циркадный фазовый сдвиг, так и на температурную регуляцию сна [64]. У линий с делециями генов БТШ70 наблюдается тенденция к снижению продолжительности жизни на свету [65].

По имевшимся ранее представлениям, тепловой шок как стрессорный фактор оказывает на

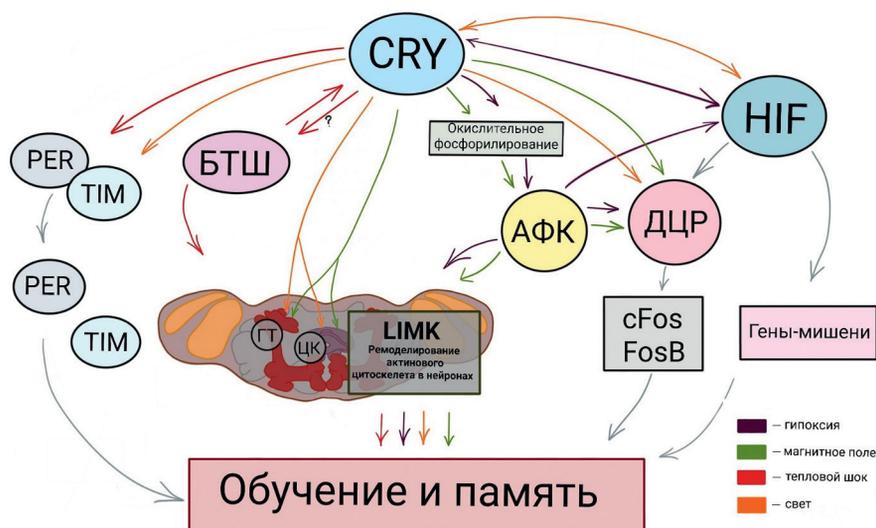


Рис. 8. Гипотетическая схема роли CRY: БТШ — белки теплового шока; АФК — активные формы кислорода; ДЦР — двухцепочечные разрывы; ГТ — грибовидные тела; ЦК — центральный комплекс. Стрелки отражают влияние на процессы, описание которых изложено в тексте.

живые объекты только негативное воздействие, в том числе путем модификации продуктов мутантных аллелей [66]. Однако детальное изучение БТШ и установление их шаперонной функции привело к переосмыслению роли теплового шока. Согласно нашим данным, мутация *agn^{ts3}* при перmissive температуре нарушает обучение и память при условно-рефлекторном подавлении ухаживания у самцов, при воздействии теплового шока эти показатели восстанавливаются до уровня дикого типа [67, 68]. В этой связи интересны данные о роли белков теплового шока (БТШ70) в обучении и памяти, а также регулирующем влиянии БТШ27 на динамику актиновых филаментов [2, 69]. На рис. 7 представлена схема взаимосвязи системы циркадных ритмов и стрессорного ответа на температурный шок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Все четыре фактора внешней среды — освещение, геомагнитное поле, температура, давление — содержание кислорода оказались связаны между собой не только общим сенсором — CRY, выполняющим функции синхронизатора часовых ритмов, температуры, гипоксии, но и общей мишенью — динамикой актинового цитоскелета. На уровне генетического аппарата такой мишенью является ДНК, которая реагирует на стрессорные и когнитивные вызовы формированием разрывов. Гипотетическая схема роли CRY — сенсора экологически значимых стрессорных факторов представлена на рис. 8.

Исследование генетических хабов, к которым сходятся многие внешние воздействия, позволит подойти к терапии сложных синдромов, оказывающих системное воздействие на организм. Примером может служить использование ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) в качестве терапевтического воздействия. Полученные данные об увеличении экспрессии CRY и HIF-1 α , основных факторов клеточной транскрипции, при воздействии ЯМР позволяют в дальнейшем применять эту технологию в качестве немедикаментозного подхода к изменению уровня HIF-1 α . Связанные с ним циркадные часы играют ключевую роль в заболеваниях на фоне ишемии — инфаркт, инсульт и рак, а также в инфекционных заболеваниях, таких как Covid-19 [45].

В перспективе подобные исследования могут лечь в основу методов терапии когнитивных, сердечно-сосудистых и других заболеваний с использованием света, гипоксического preconditionирования и ОСМП.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана средствами федерального бюджета в рамках государственного задания ФГБУН Института физиологии им. И. П. Павлова РАН (№1021062411629-7-3.1.4).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лобашев М.Е., Савватеев В.Б. Физиология суточного ритма животных. М., Л.: Изд-во АН СССР, 1959. 259 с.
2. Zatsepina O.G., Nikitina E.A., Shilova V.Y., Chuvakova L.N., Sorokina S., Vorontsova Yu.E., Tokmatcheva E.V., Funikov S. Yu., Rezyukh A.P., Evgeniev M.B. // Cell Stress and Chaperones. 2021. V. 26. № 3. P. 575–594.
3. Damulewicz M., Mazzotta G.M. // Front Physiol. 2020. V. 11. Art. 99.
4. Agrawal P., Houl J.H., Gunawardhana K.L., Liu T., Zhou J., Zoran M.J., Hardin P.E. // Curr Biol. 2017. V. 16. P. 2431–2441.
5. Karki N., Vergish S., Zoltovski B.D. // Protein Science. 2021. V. 30. № 8. P. 1521–1534.
6. Cusumano P., Damulewicz M., Carboognin E., Caccin L., Puricella V., Specchia M., Bozzetti P., Costa R., Mazzotta G.M. // Front Physiol. 2019. V. 10. Art. 133.
7. Helfrich-Förster C. // Genes Brain Behav. 2005. V. 4. P. 65–76.
8. Hermann-Luibl C., Helfrich-Förster C. // Curr. Opin. Insect Sci. 2015. V. 7. P. 65–70.
9. Yoshii T., Ahmad M., Helfrich-Förster C. // PLoS Biol. 2009. V. 7. Art. 1000086.
10. Shang Y., Haynes P., Pérez N., Harrington K.I., Guo F., Pollack J., Hong P., Griffith L.C., Rosbash M. // Nat Neurosci. 2011. V. 14. № 7. P. 889–895.
11. Yamamoto Sh., Seto E.S. // Exp Anim. 2014. V. 63. № 2. P. 107–119.
12. Tabuch M., Coates K.E., Bautista O.B., Zukowski L.H. // Front Neurol. 2021. V. 12. Art. 625369.
13. Sitaraman D., Aso Y., Jin X. // Curr Biol. 2015. V. 25. № 22. P. 2915–2927.
14. Flyer-Adams J., Rivera-Rodriguez E.J., Yu J. Junwei Yu, Jacob D. Mardovin, Martha L. Reed, Leslie C. Griffith // J Neurosci. 2020. V. 40. P. 9066–9077.
15. Fogle K., Parson K.G., Dahm N.A., Holmes T.C. // Science. 2011. V. 331. P. 1409–1413.
16. Sitaraman D., Aso Y., Jin X., Rubin G.M., Nitabach M.N. // Curr Biol. 2015. V. 25. P. 2915–2927.
17. Pokorny R., Klar T., Hennecke U., Carell T. // Proc Natl Acad Sci. 2008. V. 105. № 52. P. 21023–21027.
18. Romero-Franco A., Checa-Rodríguez C., Maikel Castellano-Pozo M., Miras H., Wals A., Huertas P. // 22.01.2023 on bioRxiv preprint.
19. Boutros S.W., Krenik D., Holden S., Vivek K. Unni, Raber J. // Oncotarget. 2022. V. 13. P. 198–213.
20. Никитина Е.А., Васильева С.А., Щеголев Б.Ф., Савватеева-Попова Е.В. // Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова. 2022. Т. 72. № 6. С. 783–799.
21. Eichwald C., Walleczek J. // Biophysical Journal. 1996. V. 71. № 2. P. 623–631.
22. Izmaylov A.F., Tully J.C., Frisch M.J. // Journal of Physical Chemistry A. 2009. V. 113. № 44. P. 12276–12284.
23. Rodgers C.T., Hore P.J. // Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 2009. V. 106. № 2. P. 353–360.
24. Kaushik R., Nawathean P., Busza A., Murad A., Emery P., Rosbash M. // PLoS Biology. 2007. V. 5. № 6. P. 1257–1266.
25. Solov'yov I.A., Schulten K. // Biophys. J. 2009. V. 96. № 12. P. 4804–4813.
26. Nikitina E.A., Medvedeva A.V., Gerasimenko M.S., Pronikov V.S., Surma S.V., Shchegolev B.F., Savvateeva-Popova E.V. // Neuroscience and Behavioral Physiology. 2018. V. 48. № 7. P. 796–803.
27. Nikitina E.A., Medvedeva A.V., Zakharov G.A., Savvateeva-Popova E.V. // Acta Naturae. 2014. V. 6. № 2. P. 53–61.
28. Borovac J., Bosch M., Okamoto K. // Mol Cell Neurosci. 2018. V. 91. P. 122–130.
29. Misu S., Takebayashi M., Kei M. // Frontiers in Genetics. 2017. V. 8. Art. 27.
30. Kamyshev N.G., Iliadi K.G., Bragina J.V. // Learning & Memory. 1999. V. 6. № 1. P. 1–20.
31. Vasilieva S.A., Tokmatcheva E.V., Medvedeva A.V., Ermilova A.A., Nikitina E.A., Shchegolev B.F., Surma S.V., Savvateeva-Popova E.V. // Cell and Tissue Biology. 2020. V. 14. № 3. P. 178–189.
32. Mehta N., Cheng H.Y.M. // J. Mol. Biol. 2012. V. 425. № 19. P. 3609–3624.
33. Savvateeva-Popova E.V., Zhuravlev A.V., Brázda V., Zakharov G.A., Kaminskaya A.N., Medvedeva A.V., Nikitina E.A., Tokmatcheva E.V., Dolgaya J.F., Kulikova D.A., Zatsepina O.G., Funikov S.Y., Ryazan-sky S.S., Evgen'ev M.B. // Front. Genet. 2017. V. 8. Art. 123.
34. Sempere L.F., Sokol N.S., Dubrovsky E.B., Berger EM, Ambros V. // Dev. Biol. 2003. V. 259. № 1. P. 9–18.
35. Weng R., Chin J.S.R., Yew J.Y. // eLife. 2013. V. 2. Art. e00640.
36. Xue Y., Zhang Y. // BMC Neurosci. 2018. V. 19. № 1. <https://doi.org/10.1186/s12868-018-0401-8>
37. Медведева А.В., Реброва А.В., Заломеева Е.С. // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 2022. Т. 58. № 1. С. 34–42.
38. Adel M., Griffith L.C. // Neuroscience Bulletin. 2021. V. 37. № 6. P. 831–852.
39. Davis R.L., Zhong Y. // Neuron. 2017. V. 95. P. 490–503.
40. Kasture A.S., Hummel T., Sucic S., Freissmuth M. // International Journal of Molecular Sciences. 2018. V. 19. Art. 1788.
41. Suberbielle E., Sanchez P.E., Kravitz A.V. // Nature Neuroscience. 2013. V. 16. № 5. P. 613–621.

42. Verheijen B.M., Vermulst M., van Leeuwen F.W. // *Acta Neuropathologica*. 2018. V. 135. № 6. P. 811–826.
43. Ishikawa T., Matsumoto A., Kato T. Jr., Togashi S., Ryo H., Ikenaga M., Todo T., Ueda R., Tanimura T. // *Genes Cells*. 1999. V. 4. № 1. P. 57–65.
44. Smith K.D., Fu M.A., Brown E.J. // *Journal of Cell Biology*. 2009. V. 187. № 1. P. 15–23.
45. Thöni V., Oliva R., Mauracher D., Egg M. // *Chronobiology International*. 2021. V. 38. № 8. P. 1120–1134.
46. Bozek K., Kiełbasa S.M., Kramer A., Herzel H. // *Genomics & Informatics*. 2007. V. 18. P. 65–74.
47. Peek C., Levine D.C., Cedernaes J., Taguchi A., Kobayashi Y., Tsai S.J., Bonar N.A., McNulty M.R., Ramsey K.M., Bass J. // *Cell Metab*. 2017. V. 25. № 1. P. 86–92.
48. Elhalel G., Price C., Fixler D., Shainberg A. // *Scientific Reports*. 2019. V. 9. № 1. Art. 1645.
49. Vaughan M.E., Wallace M., Handzlik M.K. // *Science*. 2020. V. 23. № 7. Art. 101338.
50. Hernansanz-Agustín P., Enríquez J.A. // *Antioxidants*. 2021. V. 10. № 3. Art. 415.
51. Бучаченко А.Л. // *Усп. химии*. 2014. Т. 83. № 1. С. 1–12.
52. Srinivas U.S., Tan B.W.Q., Vellayappan B.A., Jeyasekharan A.D. // *Redox Biology*. 2019. V. 25. Art. 101084.
53. Caldecott K.W., Ward M.E., Nussenzweig A. // *Nature Genetics*. 2022. V. 54. P. 115–120.
54. Caridi C.P., Plessner M., Grosse R., Chiolo I. // *Nat Cell Biol*. 2019. V. 21. № 9. P. 1068–1077.
55. Xu Q., Huff L., Fujii M., Griendling K. // *Free Radic Biol Med*. 2017. V. 109. P. 84–107.
56. Медведева А.В., Токмачева Е.В., Никитина Е.А., Васильева С.А., Заломая Е.С., Савватеева-Попова Е.В. // *Медицинский академический журнал*. 2020. Т. 20. № 4. С. 45–54.
57. Movafagh Sh., Crooc S., Vo K. // *J Cell Biochem*. 2015. V. 116. № 5. P. 696–703.
58. Wozny A.-S., Gauthier A., Alphonse G. // *Cancers*. 2021. V. 13. № 15. Art. 3833.
59. Cheng L., Yu H., Yan N., Lai K., Xiang M. // *Front. Cell. Neurosci*. 2017. V. 11. Art. 20.
60. Bellemer A. // *Temperature (Austin)*. 2015. V. 16. P. 2227–2243.
61. Gentile C., Sehodova H., Chen Ch., Stanewsky R. // *Curr Biol*. 2013. V. 23. P. 185–195.
62. Yoshii T., Hermann Ch., Helfrich-Forster Ch. // *J Biol Rhythms*. 2010. V. 25. № 6. P. 387–398.
63. D'Amico-Damião V., Carvalho R F. // *Front. Plant Sci*. 2018. V. 9. Art. 1897.
64. Kidd P B., Young M V., Siggia E D. // *PNAS*. 2015. V. 112. № 46. P. 6284–6292.
65. Москалев А.А., Малышева О.А. // *Экологическая генетика*. 2010. Т. 8. С. 67–80.
66. Никитина Е.А., Комарова А.В., Голубкова Е.В. // *Генетика*. 2003. Т. 39. № 3. С. 341–348.
67. Nikitina E.A., Kaminskaya A.N., Molotkov D.A., Popov A.V., Savvateeva-Popova E.V. // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 2014. V. 50. № 2. P. 154–166.
68. Никитина Е.А., Медведева А.В., Долгая Ю.Ф. // *Журнал эволюционной биохимии и физиологии*. 2012. Т. 48. № 6. С. 588–596.
69. Doshi B., Hightower L.E., Lee J. // *Cell Stress Chaperones*. 2009. V. 14. P. 445–457.

Stress Influences and Cognitive Activity: Search for Targets and General Mechanisms Using *Drosophila* Mutants

D. M. Karovetskaya^{1,2}, A. V. Medvedeva², E. V. Tokmacheva²,
S. A. Vasilyeva^{1,2}, A. V. Rebrova¹, E. A. Nikitina^{1,2}, B. F. Shchegolev²,
and E. V. Savvateeva-Popova²

¹Russian State Pedagogical University named after A. I. Herzen, St. Petersburg, Russia

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

According to modern concepts, biochemical cascades activated in response to stress impacts also contribute to cognitive functions, such as learning and memory formation. Considering a conditioned reflex as an adaptation to the external environment, one can assume its occurrence as a reaction to external challenges, which, when reinforced, contribute to the formation of a conditioned connection, and in the absence, cause the development of a stress response. The metabolic activity of the body is inextricably linked with circadian rhythms, which determine the daily fluctuations in light, temperature, oxygen content and magnetic field. The integration of these timers is carried out by a protein of the cryptochrome family (CRY), which functions as a blue light receptor and is

known as a repressor of the main circadian transcription complex CLOCK/BMAL1. In order to develop methods for non-invasive correction of pathologies of the nervous system on a model object of genetics – *Drosophila* using mutant lines, the relationship between adaptive mechanisms for the formation of a conditioned connection and the development of a stress response to a weakening of the magnetic field, hypoxic and temperature effects is studied. The data are discussed in light of the role of the CRY/CLOCK/BMAL1 system as a link in magnetoreception, hypoxia, circadian rhythm regulation, cognitive functions, and DNA double-strand breaks in nerve ganglia (an indicator of the physiological activity of neurons).

Keywords: learning, memory, cryptochromes, magnetic field, hypoxia, temperature exposure

ЦИЛИАРНЫЙ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ БИОМАРКЕР ЦЕРЕБРАЛЬНЫХ ПАТОЛОГИЙ

© 2024 г. А. А. Гудкова^{1, *}

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

*E-mail: gudkov_ann@mail.ru

Поступила в редакцию 19.03.2024 г.

После доработки 20.03.2024 г.

Принята к публикации 21.03.2024 г.

Цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) – это плюрипотентный нейротрофический фактор с высоким нейротрофическим потенциалом, нейроцитокин, который продемонстрировал потенциал в терапии нейродегенеративных, психических и метаболических заболеваний. Доклинические данные подтверждают общую концепцию о его потенциальных нейротрофических и трофических эффектах, а недавно полученные клинические данные подтверждают предположение о потенциальной роли CNTF в лечении нейродегенерации и ожирения. Ряд данных указывают на вовлеченность CNTF в стресс-реактивность и патогенез аффективных расстройств. Данные исследований уровней CNTF в инвазивном (кровь) и неинвазивном (слезы) биоматериале человека предполагают возможность его использования в качестве биомаркера определенных заболеваний головного мозга, хотя для подтверждения этого необходимо провести дополнительные исследования.

Ключевые слова: цилиарный нейротрофический фактор, CNTF, заболевания головного мозга, нейротрофическая, когнитивные нарушения, метаболические заболевания, стресс, депрессия, кровь, слезная жидкость, биомаркер

DOI: 10.31857/S1027813324010071, EDN: GYYOWN

ВВЕДЕНИЕ

Открытие нейротрофинов и их мощных эффектов на выживание и трофику нейронов стимулировало обсуждение их потенциального терапевтического применения для поддержки погибающих нейронов при нейродегенеративных заболеваниях. Три десятилетия исследований выявили выраженную трофическую и регуляторную активность цилиарного нейротрофического фактора (CNTF) в нейронах, астроцитах, олигодендроцитах, мышечных клетках, костных клетках, адипоцитах и клетках сетчатки. CNTF участвует в широком спектре жизненно важных процессов, от поддержки выживания нейронов до энергетического метаболизма организма [1]. С одной стороны, эти результаты привели к клиническим испытаниям для проверки терапевтического потенциала CNTF и производных CNTF для лечения нейродегенеративных и метаболических заболеваний. Многообещающие результаты стимулировали продолжение исследований по лечению дегенеративных заболеваний сетчатки, в основном основанных на местной доставке CNTF с использованием инкапсулированных

имплантатов, секретирующих цитокины. Дальнейшие разработки могут оказаться прорывом в терапевтическом применении системно вводимого CNTF при таких патологиях, как заболевания двигательного нейрона (боковой амиотрофической склероз), рассеянный склероз или болезнь Альцгеймера [2, 3]. С другой стороны, участие CNTF в патогенезе различных заболеваний головного мозга стимулировало исследования этого нейротрофического фактора в биологическом материале как многообещающего биомаркера, полезного для диагностических и прогностических целей.

ЦИЛИАРНЫЙ НЕЙРОТРОФИЧЕСКИЙ ФАКТОР (CNTF)

CNTF – это плюрипотентный нейротрофический фактор, первоначально выделенный из цилиарных нейронов куриного эмбриона. Волокна, включающие иммунореактивность рецептора CNTF (CNTFR), были идентифицированы в латеральных пучках переднего мозга, мезенцефальном и лобном отделах, а также в вестибулярном нерве цыпленка [4]. CNTF относится к цитокиновому семейству

интерлейкина (IL)-6. Это семейство представляет собой группу цитокинов, включающую IL-6, IL-11, цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), фактор ингибирования лейкемии (LIF), онкостатин М (OSM), кардиотрофин 1 (CT-1), кардиотрофиноподобный цитокин (CLC) и IL-27. Они объединены в одно семейство, поскольку рецепторный комплекс каждого цитокина содержит две (IL-6 и IL-11) или одну молекулу (все остальные цитокины) субъединицы сигнального рецептора gp130 [5, 6]. CNTF является наиболее широко изученным представителем этого семейства цитокинов, которые передают сигнал через внутриклеточные цепи рецептора gp130/LIFR β . Подобно другим нейротрофинам (например, NGF, GDNF) семейство IL-6, включая CNTF, имеет набор рецепторов, специфичных для отдельных членов семейства, и общий рецептор не специфичный для членов семейства, который в некоторых семействах опосредует клеточный сигнал и ретроградный транспорт [7].

CNTF – белок с молекулярной массой 22,8 кДа, структурно похожий на LIF, IL-6 и IL-11 и OSM. Это димер из 200 аминокислот с непараллельным расположением субъединиц. У людей, крыс, кроликов и мышей CNTF гомологичны на 81–83%. Действие CNTF реализуется при связывании с рецепторным комплексом, включающим α -субъединицу, фиксирующую лиганд рецептора CNTF (CNTFR α), и две β -субъединицы, передающие сигнал (LIF Rgp 130). Рецепторный комплекс соединен с поверхностью клетки гликозилфосфатидилинозитоловой связью, благодаря которой рецептор может функционировать в растворимой форме [8].

CNTF поддерживает клетки центральной и периферической нервной системы, включая нейроны гиппокампа и срединной перегородки, симпатические ганглии, двигательные нейроны, сенсорные нейроны, влияет на состояние стволовых эмбриональных клеток, предотвращает дегенерацию двигательных аксонов после их перерезки и способствует дифференцировке астроцитов и созреванию олигодендроцитов [9]. В аксонах передача сигналов CNTF играет важную роль в динамике микротрубочек [10].

УЧАСТИЕ CNTF В НЕЙРОПРОТЕКЦИИ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

CNTF участвует в развитии и поддержании зрительной нервной системы и используется при многих заболеваниях, связанных с патологиями зрения. CNTF связан с нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Паркинсона и болезнь Альцгеймера, а также психическими заболеваниями [1]. Доставка CNTF в специфические компартменты предлагается в качестве терапии болезни Хантингтона и пигментного ретинита [11]. CNTF обладает нейропротекторной активностью

в отношении клеток кохлеарных волосков и ганглия улитки внутреннего уха, когда они повреждаются при интенсивном звуковом воздействии [12]. Нейропротекторные эффекты CNTF были продемонстрированы на ряде клеточных моделей *in vitro*, а также *in vivo* на мутантных мышцах, у которых наблюдается дегенерация двигательных нейронов. Было показано, что в дополнение к его нейрональному действию CNTF и аналоги воздействуют на ненейронные клетки, такие как глия, гепатоциты, скелетные мышцы и стромальные клетки костного мозга [13]. Нейропротекторные эффекты CNTF включают его воздействие на ряд систем. Например, экспрессия гена опиоидного пептида ноцицептин/орфанин (N/OFP) зависит от CNTF, он повышает уровень мРНК орфанина/ноцицептина в нейронах полосатого тела и коры головного мозга в 5–9 раз [14]. CNTF активирует тирозиновую протеинкиназу и сигнальные молекулы, которые индуцируют транскрипцию N/OFP [15].

Инъекции 200 нг рекомбинантного CNTF в неокортекс крысы приводили к увеличению объема ядра и сомы протоплазматических и фиброзных астроцитов в течение 48 ч. Добавление CNTF к культуре глиальных клеток вызывает увеличение размера астроцитов. Таким образом активация астроцитов и стимулирование гипертрофии глиальных клеток CNTF опосредует вызываемые этим фактором изменения в клетках головного мозга при неврологических заболеваниях [16].

CNTF рассматривается как предполагаемое связующее звено между рецепторами дофамина D2 и нейрогенезом [17]. Как и другие нейротрофические факторы, CNTF, по-видимому, играет положительную роль в индуцированном психостимуляторами поведении и нейрональной пластичности [18]. CNTF оказывает воздействие на скелетные мышцы, одну из его основных тканей-мишеней за пределами центральной нервной системы [19]. У мышей введение CNTF способствует регенерации миофибрилл поврежденных скелетных мышц [20].

CNTF И КОГНИТИВНЫЕ НАРУШЕНИЯ

CNTF проявляет мощную нейротрофическую активность в периферических и центральных нейронах как *in vitro*, так и *in vivo*. Чтобы оценить, предотвращает ли CNTF потерю нейронов вследствие очаговой ишемии головного мозга, в исследовании *in vivo* CNTF непрерывно вводили в боковую желудочек в течение 4-х недель, после перманентной окклюзии левой средней мозговой артерии у крыс со спонтанной гипертензией, подверженных инсульту. Введение CNTF дозозависимым образом предотвращало индуцированные ишемией нарушения обучения у крыс в водном лабиринте Морриса. У крыс с ишемией при

гистологическом исследовании инфаркт коры головного мозга и ретроградная дегенерация ипсилатеральных таламических нейронов были значительно менее выражены после инфузии CNTF [21].

Гибель нейронов гиппокампа является одним из ключевых факторов, способствующих когнитивным нарушениям при хронической гипоперфузии головного мозга. В группах крыс с хронической церебральной 4- и 8-недельной гипоперфузией (модель двухсторонней окклюзии сонной артерии) наблюдались ухудшение памяти и усиленный апоптоз нейронов гиппокампа, а также ингибирование передачи сигналов CNTF/CNTFRa/JAK2/STAT3 по сравнению с ложно оперированными крысами [22]. Подавление экспрессии CNTF/CNTFRa и активация пути JAK2/STAT3 в результате введения DL-3-n-бутилфталата *in vivo* или при кислородно-глюкозной депривации /реперфузии *in vitro* защищало от когнитивных нарушений у крыс и предотвращало апоптоз нейронов гиппокампа соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что нейропротекторный эффект был достигнут за счет модуляции сигнальных путей CNTF/CNTFRa/JAK2/STAT3.

В мышинной модели болезни Альцгеймера локальная доставка CNTF предотвращала индуцированное олигомером амилоид- β (A β) синаптическое повреждение и связанные с ним когнитивные нарушения [23]. Рекombинантные клетки, секретирующие CNTF, инкапсулированные в полимеры, использовались для длительного введения CNTF в мозг. Имплантация таких биореакторов в мозг мышей, которым вводили олигомер A β , приводила к непрерывной секреции рекombинантного CNTF. Введение CNTF вызывало полное восстановление когнитивных функций, связанных со стабилизацией синаптического белка в мышинной модели Tg2576-AD. CNTF *in vitro* и *in vivo* активировал Янус-киназу/преобразователь сигналов и активатор опосредованной транскрипции пути выживания, что предотвращало синаптическую и нервную дегенерацию. В другом экспериментальном исследовании на трансгенной модели болезни Альцгеймера у мышей 3xTg-AD с выраженным дефицитом нейрогенеза и нейропластичности и когнитивными нарушениями еще до образования нейрофибриллярных клубков или A β -бляшек было показано, что периферическое введение пептида 6.11-mer, который формирует активную область CNTF (аминокислотные остатки 146–156), восстанавливал когнитивные способности за счет усиления нейрогенеза и пластичности нейронов [24]. Введение этого пептида усиливало нейрогенез в зубчатой извилине, повышало пластичность нейронов в гиппокампе и коре головного мозга, не оказывая при этом никакого влияния на патологические изменения экспрессии A β и белка тау у 9-месячных мышей.

CNTF, СТРЕСС И ДЕПРЕССИВНЫЕ РАССТРОЙСТВА

Цилиарный нейротрофический фактор (CNTF) вырабатывается астроцитами, которые участвуют в регуляции реакций на стресс. Участие CNTF в регуляции развития нейронов, нейропротекции и его влияние на когнитивные процессы предполагают его вовлеченность в развитие депрессии и тревоги [25]. Экспериментальная модель депрессии у грызунов была использована для изучения предполагаемой роли CNTF в депрессивноподобном и тревожноподобном поведении. Аффективное поведение изучалось в течение 10–20 недель у молодых мышей с дефицитом CNTF (CNTF $^{-/-}$). У мышей CNTF $^{-/-}$ повышенное тревожноподобное поведение проявлялось в сокращении на 30% времени, проведенного в светлом отсеке темно-светлой камеры. Животные также продемонстрировали значительное усиление реакции на электрошок и выученную беспомощность, что говорит о том, что они были склонны к депрессивному поведению. В гиппокампе 20-недельных, но не 10-недельных мышей CNTF $^{-/-}$ эти изменения коррелировали с потерей иммунореактивных ГАМКергических парвальбумин-позитивных интернейронов, снижением уровня серотонина, а также экспрессии рецептора 5-HT $1A$ [25]. Модуляция уровней моноаминергических нейромедиаторов при хроническом применении амитриптилина и циталопрама не оказывала положительного эффекта, что может свидетельствовать о ключевой роли эндогенного CNTF в структурном поддержании функций гиппокампа и его важном влиянии на аффективное поведение в моделях тревоги и депрессии у грызунов.

Другое исследование было направлено на оценку того, влияет ли CNTF на депрессивное и тревожноподобное поведение взрослых мышей, используя тесты принудительного плавания, предпочтения сахарозы и приподнятого T-лабиринта [26]. Самки мышей дикого типа CNTF $^{+/+}$ были более предрасположены (чем самцы одного помета CNTF $^{+/+}$) к развитию поведения отчаяния: увеличивалось время иммобильности и снижался латентный период до неподвижности в тесте принудительного плавания. У мышей CNTF $^{-/-}$ дефицит CNTF оказывал противоположный эффект на депрессивноподобное поведение. У самок этих мышей было снижено время неподвижности и повышено предпочтение сахарозы по сравнению с самцами, у которых время иммобильности было увеличено. Самки дикого типа экспрессировали больше CNTF в миндалине, чем самцы. Овариэктомия увеличивала экспрессию CNTF и время неподвижности. У мышей CNTF $^{-/-}$ этот показатель был значительно снижен, что позволяет предположить, что CNTF ассоциирован с временем неподвижности, вызванным овариэктомией, возможно, оказывая эффект на уровне миндалины. Лечение

прогестероном снижало экспрессию CNTF в миндалине и время неподвижности у самок CNTF+/+, но не у мышей CNTF-/- . Кастрация не изменила ни экспрессию CNTF у самцов, ни их поведение. Не было обнаружено влияния CNTF на поведение в приподнятом Т-лабиринте и поведенческом тесте на тревожность. Это позволяет предположить, что в основе тревожноподобного поведения лежит другой механизм [26]. В целом это исследование раскрывает новый, опосредованный CNTF, механизм вызванного стрессом депрессивноподобного поведения и указывает на возможности лечения депрессии с учетом пола, например, с использованием препаратов, стимулирующих CNTF, у мужчин.

Обнаружено, что у самок (но не самцов) мышей CNTF в медиальной миндалине способствует поведению отчаяния или пассивному совладанию в тесте вынужденного плавания. Нейтрализующее CNTF антитело, введенное в миндалину самок дикого типа, снижало активацию STAT3(Y705) [2]. Это антитело снижало неподвижность в тесте плавания у самок и только после инъекции в медиальную область, но не центральную или базолатеральную миндалину. У самцов эти эффекты не наблюдались. Эти данные раскрывают уникальную роль CNTF в медиальной миндалине самок в развитии поведения отчаяния или пассивного совладающего поведения. Хронический непредсказуемый стресс усиливал неподвижность в тесте вынужденного плавания и снижал предпочтение сахарозы у мышей дикого типа CNTF +/+, но не у нокаутных самок мышей CNTF-/- . Короткий острый иммобилизационный стресс после хронического повышал уровень кортикостерона в плазме крови только у самок CNTF+/+. У самцов обоих генотипов эффекты хронического стресса присутствовали. Кроме того, хронический стресс увеличивал экспрессию CNTF в медиальной миндалине самок, но не самцов мышей [2].

Фармакологическое ингибирование киназы фокальной адгезии (ФАК) усиливает экспрессию CNTF [1]. Индуцируемый нокаут ФАК в астроцитах или системное введение ингибитора ФАК увеличивали пассивное совладающее поведение, т.е. неподвижность в стресс-тесте на вынужденное плавание у самок, но не самцов мышей. Хронический непредсказуемый стресс не привел к дальнейшему усилению пассивного совладания у самок мышей с нокаутом ФАК в астроцитах, тогда как у самок мышей дикого типа и самцов мышей обоих генотипов оно усугубилось. Эти данные свидетельствуют о том, что ФАК астроцитов необходима для пассивного преодоления хронического стресса у самок. Хронический стресс снижал уровень фосфорилированной ФАК и повышал содержание CNTF в медиальной миндалине самок. Введение прогестерона после овариэктомии активировало ФАК миндалевидного тела и облегчало

пассивное совладание, вызванное овариэктомией, у самок дикого типа, но не у самок с нокаутом астроцитарного ФАК. Это позволяет предположить, что опосредованная прогестероном активация ФАК в астроцитах снижает реакцию самок на стресс [1]. Нокаут астроцитарного ФАК или введение ингибиторов ФАК увеличивало экспрессию CNTF в медиальной миндалине у мышей обоего пола. Поскольку CNTF в этой области мозга вовлечен в стрессовые реакции только у самок, это объясняет специфическую для самок роль ингибирования астроцитарной ФАК. Это исследование раскрывает новый, специфичный для самок прогестерон-астроцитарный путь ФАК, который противодействует опосредованным CNTF реакциям на стресс и указывает на возможности разработки новых методов лечения связанных со стрессом расстройств у женщин [1].

Вызванная стрессом активность коры поддерживается повышенной возбудимостью норадренергических нейронов, иннервирующих, в частности, префронтальную кору. Показано, что нейроны, высвобождающие кортикотропин-рилизинг-гормон гипоталамуса, иннервируют эпендимальные клетки 3-го желудочка, индуцируя высвобождение CNTF для транспортировки через Сильвиеву водопроводную систему головного мозга [6]. Связывание CNTF с его рецептором на норадренергических нейронах в голубом пятне затем инициирует последовательное фосфорилирование внеклеточной сигнал-регулируемой киназы 1 и тирозингидроксилазы с помощью секретогогина Ca²⁺-сенсора, обеспечивающего зависимость активности как в мозге грызунов, так и в мозге человека. Как CNTF, так и удаление секретогогина блокируют вызванный стрессом синтез кортикального норадреналина, приводящий к возбуждению нейронов и стереотипному поведению. Таким образом, выявлен мультимодальный путь, скорость которого ограничена объемом передачи CNTF и который способен осуществлять прямое преобразование активации гипоталамуса в длительную возбудимость коры головного мозга после острого стресса [6].

Дефицит когнитивной гибкости, т.е. способности изменять поведение в ответ на изменения в окружающей среде / стресс, отмечено при ряде психических расстройств и часто не поддается лечению. Хронический стресс у крыс вызывает избирательный дефицит в реверсивном обучении, форме когнитивной гибкости, зависящей от функции орбитофронтальной коры. В этой области хронический стресс снижает уровни фосфорилированной киназы JAK2 и CNTF, промотора выживания нейронов и активатора передачи сигналов JAK2 [3]. Нейтрализация эндогенного CNTF с помощью микроинъекции специфического антитела достаточна для возникновения дефицита обратного обучения, аналогично действию стресса.

Системное введение рекомбинантного CNTF крысам, подвергнутым стрессу, устраняет дефицит обратного обучения, а блокада Akt предотвращает положительные эффекты CNTF. Показано, что CNTF может оказывать свое благотворное воздействие путем ингибирования киназы гликогенсинтазы GSK3 β , субстрата Akt и регулятора деградации белка [3]. Выявлен также новый механизм действия CNTF посредством модуляции передачи сигналов p38/Mnk1/eIF4E. Этот каскад контролирует трансляцию отдельных мРНК, включая те, которые кодируют несколько белков, связанных с пластичностью. Таким образом, управляемая CNTF передача сигналов JAK2 корректирует вызванный стрессом дефицит обратного обучения путем модуляции стационарных уровней белков орбитофронтальной коры, связанных с пластичностью.

Mizushige et al. (2019) показали, что низкомолекулярная фракция гидролизата коллагена, расщепленного имбирем, проявляет анксиолитическую активность и, возможно, влияет на функции мозга [31]. Пероральный прием гидролизата коллагена, разрушенного имбирем, значительно снижал депрессивное поведение в тесте принудительного плавания, что подтверждает антидепрессивную активность имбиря у мышей. Эта антидепрессивная активность исчезала в результате предварительной обработки антагонистом дофаминовых рецепторов, но не антагонистом серотониновых рецепторов. Имбирь значительно увеличивал экспрессию генов глиального нейротрофического фактора (GDNF) и CNTF в гиппокампе, при этом не было обнаружено изменений в экспрессии генов BDNF, фактора роста нервов и нейротрофина-3. Имбирь также проявлял антидепрессивную активность в модели стресса у мышей, которым вводили кортикостерон, и увеличивал экспрессию GDNF и CNTF при стрессе.

Как нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), так и CNTF могут действовать сообща, модулируя развитие и функционирование синапсов. Однако ни нулевая мутация CNTF, ни полиморфизм BDNF C270T не были биомаркерами депрессии при исследовании, проведенном на пожилых жителях географического региона Вены [32]. Дружкова и соавт. [33] изучали реакции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, иммунной системы и метаболических путей при адаптации к стрессу и их изменения при депрессии. Участникам исследования было предложено выполнить когнитивное задание с ограничением времени до и через 60 мин после выполнения задания; измеряли содержание кортизола, АКТГ, IL-6, IL-1 β , TNF- α , BDNF, CNTF, глюкозы, холестерина, триглицеридов. В группе с тяжелой депрессией была выявлена повышенная активность гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, а также высокие базовые уровни IL-6 и CNTF. Таким образом, данные, полученные как в экспериментальных, так

и в клинических исследованиях, предполагают роль CNTF в развитии стресса и депрессии, однако необходимы дополнительные исследования, чтобы раскрыть конкретные задействованные механизмы.

CNTF КАК ПОТЕНЦИАЛЬНОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ТЕРАПИИ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Установлено, что канонические нейротрофические факторы, такие как BDNF и CNTF, играют важную роль в центральной регуляции энергетического гомеостаза. CNTF регулирует баланс энергетического обмена и участвует в подавлении воспаления, что важно как для всего организма в целом, так и для нервной системы. CNTF проявляет разнонаправленную физиологическую активность, регулируя транскрипцию различных генов посредством модуляции различных сигнальных путей (включая JAK/STAT, MAPK и PI3K/AKT) [1]. Недавно была признана потенциальная роль CNTF в борьбе с ожирением [34]. Наряду с лептином, на уровне среднего аркуатного ядра гипоталамуса CNTF участвует в регуляции пищевого поведения (анорексии) [9, 35], что также подтверждается исследованиями ассоциации полиморфизма гена CNTFR и массы тела человека [36]. Действуя как центрально, так и на периферии, CNTF имитирует биологические эффекты лептина, преодолевая резистентность к лептину, при этом эффект сохраняется даже после прекращения терапии при центральном введении CNTF. По-видимому, CNTF уменьшает воспалительные сигнальные каскады, связанные с накоплением липидов в печени и скелетных мышцах [37]. CNTF доказал свою эффективность в преодолении инсулинорезистентности на моделях ожирения и резистентности к лептину [38]. В целом CNTF показал многообещающие результаты в качестве потенциальной терапии против ожирения.

CNTF В КРОВИ И СЛЕЗАХ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ БИОМАРКЕР БОЛЕЗНЕЙ МОЗГА

Простота сбора и оценки слезной жидкости (СЖ) потенциально может стать удобным неинвазивным диагностическим инструментом, который легко вписывается в персонализированный подход к медицине, основанный на оценке рисков. Хотя на сегодняшний день большинство биомаркеров слезы еще не готовы к рутинному использованию из-за проблем с их клинической валидацией, учитывая огромное клиническое преимущество СЖ и появляющиеся передовые технологические подходы, разработанные для протеомного, липидомного и метаболомного анализа слез, исследования СЖ, несомненно, станут рутинным тестом для мониторинга здоровья в будущем [39]. Ряд ассоциаций

между уровнями различных веществ в СЖ и головном мозге делает СЖ бесценным источником биомаркеров заболеваний головного мозга, полезных для ранней диагностики и персонализированного лечения. СЖ является перспективным биологическим материалом, жизненно важным источником для прогнозирующих, диагностических, прогностических и механистических биомаркеров.

Выявлено снижение концентрации CNTF в СЖ пациентов с первичной открытоугольной глаукомой. Показана статистически значимая взаимосвязь между уровнем CNTF и стадиями глаукомы [40]. Эта группа также оценивала уровень CNTF в сыворотке крови и СЖ у людей с фокальной эпилепсией с помощью ИФА-анализа, усовершенствованного авторами [41]. По сравнению с контрольной группой уровень CNTF был повышен как в сыворотке крови, так и в СЖ, хотя не было обнаружено существенной корреляции между уровнем CNTF в сыворотке и СЖ ни в одной из групп. Не было обнаружено влияния сопутствующей депрессии или каких-либо демографических или клинических изученных параметров на уровни CNTF. Высокие уровни CNTF в СЖ можно рассматривать как перспективный неинвазивный биомаркер фокальной эпилепсии.

Данные немногочисленных исследований уровня CNTF в инвазивном (кровь) и неинвазивном (слезы) биоматериале человека предполагают его потенциальное использование в качестве биомаркера заболеваний головного мозга, хотя для подтверждения этого необходимо провести дополнительные исследования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Выполнено при поддержке АНО “Московский центр инновационных технологий в здравоохранении”, грант № 0702-1/23.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guo H., Chen P., Luo R., Zhang Y., Xu X., Gou X. // *Protein Pept. Lett.* 2022. V. 29. P. 815–828. doi: 10.2174/0929866529666220905105800.
2. Stansberry W.M., Pierchala B.A. // *Front. Mol. Neurosci.* 2023. V. 16. 1238453. doi:10.3389/fnmol.2023.1238453.
3. Pasquin S., Sharma M., Gauchat J.F. // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015. V. 26. P. 507–515. doi:10.1016/j.cytogfr.2015.07.007.
4. Fuhrmann S., Grabosch K., Kirsch M., Hofmann H.D. // *J. Comp. Neurol.* 2003. V. 461. P. 111–122. doi: 10.1002/cne.10701.
5. Rose-John S. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2018. V. 10. a028415. doi: 10.1101/cshperspect.a028415.
6. Pasquin S., Sharma M., Gauchat J.F. // *Cytokine.* 2016. V. 82. P. 122–124. doi: 10.1016/j.cyto.2015.12.019.
7. Neet K.E., Campenot R.B. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2001. V. 58. P. 1021–1035. doi: 10.1007/PL00000917.
8. Acheson A., Lindsay R.M. // *Seminars in Neuroscience.* 1994. V. 6. P. 333–341. <https://doi.org/10.1006/smns.1994.1042>.
9. Fargali S., Sadahiro M., Jiang C., Frick A.L., Indall T., Cogliani V., Welagen J., Lin W.J., Salton S.R. // *J. Mol. Neurosci.* 2012. V. 48. P. 654–9. doi: 10.1007/s12031-012-9790-9.
10. Jablonka S., Dombert B., Asan E., Sendtner M. // *J. Anat.* 2014. V. 224. P. 3–14. doi: 10.1111/joa.12097.
11. Emerich D.F., Thanos C.G. // *Curr. Gene Ther.* 2006. V. 6. P. 147–59. doi: 10.2174/156652306775515547.
12. Zhou Y., Zhai S., Yang W. // *Zhonghua Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi.* 1999. V. 34. P. 150–3. PMID: 12764805.
13. Sleeman M.W., Anderson K.D., Lambert P.D., Yancopoulos G.D., Wiegand S.J. // *Pharm. Acta. Helv.* 2000. V. 74. P. 265–272. doi: 10.1016/s0031-6865(99)00050-3.
14. Buzas B., Symes A.J., Cox B.M. // *J. Neurochem.* 1999. V. 72. P. 1882–9. doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0721882.x
15. Fantuzzi G., Benigni F.M., Sironi M., Conni M., Carelli L., et al. // *Cytokine.* 1995. V. 7. P. 150–156.
16. Hudgins S.N., Levison S.W. // *Exp Neurol.* 1998. V. 150. P. 171–182. doi:10.1006/exnr.1997.6735.
17. Mori M., Jefferson J.J., Hummel M., Garbe D.S. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. P. 5867–5869. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1782-08.2008.
18. Pierce R.C., Bari A.A. // *Rev. Neurosci.* 2001. V. 12. P. 95–110. doi: 10.1515/revneuro.2001.12.2.95.
19. Vergara C., Ramirez B. // *Brain. Res. Brain. Res. Rev.* 2004. V. 47. P. 161–173. doi:10.1016/j.brainresrev.2004.07.010.
20. Marques M.J., Neto H.S. // *Neurosci. Lett.* 1997. V. 234. P. 43–46. doi: 10.1016/s0304-3940(97)00659-9.
21. Kumon Y., Sakaki S., Watanabe H., Nakano K., Ohta S., Matsuda S., Yoshimura H., Sakanaka M. // *Neurosci. Lett.* 1996. V. 206. P. 141–144. doi:10.1016/s0304-3940(96)12450-2.
22. Li W., Wei D., Zhu Z., Xie X., Zhan S., Zhang R., Zhang G., Huang L. // *Front. Aging Neurosci.* 2021.

- V. 13. 587403.
doi:10.3389/fnagi.2020.587403.
23. Garcia P., Youssef I., Utvik J.K., Florent-Bécharde S., Barthélémy V., et al. // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. P. 7516–7527.
doi: 10.1523/JNEUROSCI.4182-09.2010.
 24. Blanchard J., Wanka L., Tung Y.C., Cárdenas-Aguayo Mdel C., LaFerla F.M., Iqbal K., Grundke-Iqbal I. // *Acta Neuropathol.* 2010. V. 120. P. 605–621.
doi:10.1007/s00401-010-0734-6.
 25. Peruga I., Hartwig S., Merkler D., Thöne J., Hove-mann B., Juckel G., Gold R., Linker R.A. *Behav. Brain Res.* 2012. V. 229. P. 325–332.
doi:10.1016/j.bbr.2012.01.020.
 26. Jia C., Brown R.W., Malone H.M., Burgess K.C., Gill, W.D. Keasey M.P., Hagg T. // *Psychoneuroendocrinology.* 2019. V. 100. P. 96–105.
doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.09.038.
 27. Jia C., Drew Gill W., Lovins C., Brown R.W., Hagg T. // Female-specific role of ciliary neurotrophic factor in the medial amygdala in promoting stress responses. *Neurobiol. Stress.* 2022. V. 17. 100435.
doi:10.1016/j.ynstr.2022.100435.
 28. Jia C., Gill W.D., Lovins C., Brown R.W., Hagg T. // Astrocyte focal adhesion kinase reduces passive stress coping by inhibiting ciliary neurotrophic factor only in female mice. *Neurobiol. Stress.* 2024. V. 30. 100621.
doi:10.1016/j.ynstr.2024.100621.
 29. Alpár A., Zahola P., Hanics J., Hevesi Z., Korchyńska S., et al. // Hypothalamic CNTF volume transmission shapes cortical noradrenergic excitability upon acute stress. *EMBO J.* 2018. V. 37. e100087.
doi: 10.15252/embj.2018100087.
 30. Girotti M, Silva JD, George CM, Morilak DA. // Ciliary neurotrophic factor signaling in the rat orbitofrontal cortex ameliorates stress-induced deficits in reversal learning. *Neuropharmacology.* 2019. V. 160. 107791.
doi:10.1016/j.neuropharm.2019.107791.
 31. Mizushige T., Nogimura D., Nagai A., Mitsuhashi H., Taga Y., Kusubata M., Hattori S., Kabuyama Y. // *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).* 2019. V. 65. P. 251–257.
doi:10.3177/jnsv.65.251.
 32. Grünblatt E., Hu P.E., Bambula M., Zehetmayer S., Jungwirth S., Tragl K.H., Fischer P., and Riederer P. // *J. Affect. Disord.* 2006. V. 96. P. 111–116.
doi: 10.1016/j.jad.2006.05.008.
 33. Druzhkova T., Pochigaeva K., Yakovlev A., Kazimirova E., Grishkina M., Chepelev A., Guekht A., Gulyaeva N. // *Metab. Brain. Dis.* 2019. V. 34. P. 621–629.
doi: 10.1007/s11011-018-0367-3.
 34. Duff E., Baile C.A. // *Nutr. Rev.* 2003. V. 61. P. 423–426.
doi: 10.1301/nr.2003.dec.423–426.
 35. Anderson K.D., Lambert P.D., Corcoran T.L., Murray J.D., Thabet K.E., Yancopoulos G.D., Wie-gand S.J. // *J. Neuroendocrinol.* 2003. V. 15. P. 649–660.
doi: 10.1046/j.1365-2826.2003.01043.x.
 36. Roth S.M., Metter E.J., Lee M.R., Hurley B.F., Ferrell R.E. // *J. Appl. Physiol.* 2003. V. 95. P. 1425–1430.
doi: 10.1152/jap.1999.95.6.1425.
 37. Matthews V.B., Febbraio M.A. // *J. Mol. Med. (Berl).* 2008. V. 86. P. 353–361.
doi:10.1007/s00109-007-0286-y.
 38. Allen T.L., Matthews V.B., Febbraio M.A. // *Handb. Exp. Pharmacol.* 201. V. 203. P. 179–199.
doi:10.1007/978-3-642-17214-4_9.
 39. Vavilina I.S., Shpak A.A., Druzhkova T.A., Guekht A.B., Gulyaeva N.V. // *Neurochem. J.* 2023. V. 17. P. 702–714.
<https://doi.org/10.1134/S1819712423040268>
 40. Shpak A.A., Guekht A.B., Druzhkova T.A., Kozlova K.I., Gulyaeva N.V. // *Mol. Vis.* 2017. V. 17. P. 799–809. PMID: 29225456.
 41. Shpak A., Guekht A., Druzhkova T., Rider F., Gudkova A., Gulyaeva N. // *Neurol. Sci.* 2022. V. 43. P. 493–498.
doi:10.1007/s10072-021-05338-4.

Ciliary Neurotrophic Factor as a Potential Biomarker of Cerebral Pathologies

A. A. Gudkova¹

¹Moscow Research and Clinical Center for Neuropsychiatry, Moscow Healthcare Department, Moscow, Russia

Ciliary neurotrophic factor (CNTF) is a pluripotent neurotrophic factor with high neuroprotective potential, a neurocytokine that has demonstrated potential in the therapy of neurodegenerative, psychiatric and metabolic diseases. Preclinical data support the general concept of its potential neuroprotective and trophic effects, and recent clinical data support the potential role of CNTF in the treatment of neurodegeneration and obesity. A number of data indicate the involvement of CNTF in stress reactivity and the pathogenesis of affective disorders. Data from studies of CNTF levels in invasive (blood) and non-invasive (tears) human biomaterials suggest the possibility of its use as a biomarker for certain brain diseases, although more research is needed to confirm this.

Keywords: ciliary neurotrophic factor, CNTF, brain diseases, neuroprotection, cognitive impairment, metabolic diseases, stress, depression, blood, tear fluid, biomarker

ЛОКАЛИЗАЦИЯ ЭКЗОСОМ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ И КУЛЬТИВИРУЕМЫХ КЛЕТКАХ МОЗГА МЫШИ

© 2024 г. М. Г. Ратушняк^{1, *}, А. В. Родина¹, Д. А. Шапошникова¹, Е. Ю. Москалёва¹

¹НИИЦ “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: ratushnyak_mg@nrcki.ru, ratushnyak_marya@mail.ru

Поступила в редакцию 30.05.2023 г.

После доработки 31.07.2023 г.

Принята к публикации 23.08.2023 г.

Изучена возможность переноса экзосом нейральных (НСК) и мезенхимальных (МСК) стволовых клеток (СК) мыши, меченных флуоресцентным красителем РКН26, в кору и гиппокамп головного мозга при их интраназальном введении мышам, и накопления и локализации экзосом в культивируемых клетках мозга разных типов, а также влияние экзосом НСК и МСК на параметры клеточного цикла и уровень апоптоза культивируемых НСК после облучения в дозе 4 Гр. Показано накопление экзосом полученных из культуральной среды НСК и МСК из жировой ткани мышей линии C57BL/6, и в гиппокампе, и в коре головного мозга после их интраназального введения сингенным мышам. Экзосомы обнаруживали преимущественно в перинуклеарной области клеток мозга. При культивировании НСК и дифференцированных из НСК нейронов и астроцитов мыши экзосомы также обнаруживали в перинуклеарной области клеток, а в астроцитах также и в цитоплазме. В астроцитах экзосомы накапливались наиболее эффективно. При исследовании влияния экзосом СК на клеточный цикл и уровень апоптоза облученных в дозе 4 Гр НСК показано, что через 24 ч культивирования облученных НСК в присутствии экзосом как НСК, так и МСК восстановления параметров клеточного цикла не происходит, но снижается доля НСК в состоянии апоптоза.

Ключевые слова: экзосомы, нейральные стволовые клетки, мезенхимальные стволовые клетки, головной мозг, нейроны, астроциты, гамма-облучение, апоптоз, клеточный цикл, мыши

DOI: 10.31857/S1027813324010089, EDN: GYUMZB

ВВЕДЕНИЕ

В основе патогенеза нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, послеоперационное когнитивное снижение, нарушение когнитивных функций в отдаленный период после облучения головного мозга при лучевой терапии опухолей мозга и опухолей в области головы и шеи, при травмах мозга, инсультах и инфекционных поражениях мозга, лежит нейровоспаление. Развитие нейровоспаления при этих состояниях обусловлено длительной активацией клеток микроглии, которая сопровождается секрецией активных метаболитов кислорода и азота и провоспалительных цитокинов [1, 2]. Последние активируют астроциты, которые также начинают секретировать провоспалительные цитокины, усиливая развитие нейровоспаления и повреждение нейронов, что и приводит к нарушению когнитивных функций.

В публикациях последних двух десятилетий убедительно показано, что нейральные стволовые

(НСК) и нейральные прогениторные клетки [3–7], а также мезенхимальные стромальные стволовые клетки (МСК) [8–10] обладают высокой способностью стимулировать процессы регенерации многих тканей, в том числе головного мозга, при разных типах повреждения не столько благодаря их способности к самообновлению и дифференцировке, сколько благодаря способности секретировать широкий спектр регуляторных молекул и факторов роста, в том числе в составе экзосом [11–15].

Экзосомы представляют собой экстраклеточные везикулы, которые отличаются от микровезикул и апоптотических телец способом образования, молекулярным составом и размером, который может варьировать от 30–40 до 150–200 нм. Помимо белков экзосомы содержат разные типы РНК, среди которых 60–80% составляет рРНК, 1–4% – тРНК, 3–30% – микроРНК и другие типы малых РНК и мРНК. Маркерами экзосом, используемыми для их идентификации, являются поверхностные молекулы CD9, CD63, CD81 и белок TSG101 (tumour susceptibility gene 101). Экзосомы стволовых клеток

выделяют из культуральной среды, кондиционированной этими клетками (КС) [11, 16].

Экзосомы, секретируемые НСК, обладают высокой эффективностью в лечении отдаленных пострадиационных повреждений мозга [17, 18]. Накопление и распределение экзосом, полученных из КС культивируемых клеток НСК человека, в мозге при разных способах введения – интракраниальном в область гиппокампа, внутривенном в орбитальный синус и интраназальном введении – было одинаковым, одинаковой была и эффективность трансплантированных НСК и экзосом НСК человека линии Н9 в сохранении структуры нейронов и снижении уровня нейровоспаления у облученных животных [18]. Однако локализация экзосом гомологичных НСК в мозге изучена не была.

МСК, так же как и НСК, способны оказывать защитное действие при радиационно-индуцированном повреждении головного мозга, уменьшая окислительный стресс, воспаление и снижая инфильтрацию гиппокампа клетками микроглии [19, 20].

Близкое защитное действие экзосом НСК и МСК мышцы в отношении облученных НСК показано нами ранее в экспериментах *in vitro* [21]. Также показано, что длительное интраназальное введение экзосом НСК мышцы предотвращало развитие отдаленных пострадиационных нарушений поведения и обеспечивало сохранение когнитивных функций у мышей после гамма-облучения головы [22]. Однако механизмы такого действия экзосом СК остаются недостаточно изученными.

В защитной активности экзосом НСК и МСК при повреждении мозга важную роль, по-видимому, играет их способность эффективно преодолевать гематоэнцефалический барьер и доставлять в мозг и клетки мозга – НСК, нейроны, астроциты и клетки микроглии – биологически активные вещества для регуляции их активности. В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование переноса флуоресцентно меченных экзосом НСК и МСК мышцы в кору и гиппокамп головного мозга при их интраназальном введении мышам, накопления и локализации экзосом в культивируемых клетках мозга разных типов и влияния экзосом НСК и МСК на параметры клеточного цикла и уровень апоптоза культивируемых НСК мышцы после облучения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование и фенотипирование НСК и МСК мышцы для получения КС. НСК выделяли в стерильных условиях из головного мозга неонатальных мышей линии C57BL/6, как описано ранее [23]. Все эксперименты с животными были проведены с соблюдением требований, изложенных

в директиве по охране животных, используемых в научных целях (2010/63/ EU от 22.09.2010), а также в соответствии с требованиями этического комитета НИЦ “Курчатовский институт” по вопросам биомедицинских исследований (протокол от 25.01.2023 № 02–2 пр). Животных умерщвляли путем цервикальной дислокации. Головной мозг измельчали после удаления обонятельных долей, обрабатывали активированным папаином; выделенные клетки отмывали средой DMEM/F12, ресуспендировали, считали, переносили в культуральные планшеты или бактериальные чашки Петри в культуральной среде состава: DMEM/F12, содержащей NaHCO₃, – 2.4 мг/мл, глюкозу – 0.6%; Перес – 0.5 мМ, прогестерон – 60 нг/мл, путресцин – 9.6 мкг/мл, инсулин – 4.2 мкг/мл, трансферрин – 3.8 мкг/мл, селенит натрия – 1 мкг/мл, гепарин – 1.8 мкг/мл (все компоненты Sigma-Aldrich), EGF (PeproTech) – 20 нг/мл, bFGF (PeproTech) – 10 нг/мл, B27 (Life Technologies) – 2% и культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Через 5–7 сут культивирования сформировавшиеся нейросферы размером 150–200 мкм ресуспендировали в растворе аккумуля (Thermo Fisher Scientific, США) для диссоциации, клетки подсчитывали и рассеивали в культуральной среде при плотности 10–20 клеток/мкл. После восьмого пассажа клетки культивировали в среде состава Neurobasal A + Advanced DMEM/F12 (1:1), содержащей 2% бессывороточной добавки B27, 20 нг/мл фактора EGF, 10 нг/мл фактора bFGF и 2 нг/мл гепарина. Клетки культивировали в суспензии в виде нейросфер на низко адгезивном пластике и в виде монослойной культуры на подложке, сформированной с помощью Geltrex (Corning, США). Для фенотипирования НСК нейросферы диссоциировали и клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером Дюльбеко. Анализ антигенов проводили с использованием антител к O4 – конъюгат с аллофикоцианином (Miltenyi Biotec); антител к NG2 – конъюгат с Alexa Fluor 488 (Merk Millipore); антител к нестину – конъюгат с Alexa Fluor 488 (Merk Millipore); антител к β-тубулину III (клон TUJ1) – конъюгат с Alexa Fluor 488 (BioLegend); антител к GFAP – конъюгат с аллофикоцианином (Miltenyi Biotec). Фиксировали НСК мышцы 2%-ным параформальдегидом при комнатной температуре в течение 30 мин. Для анализа поверхностных антигенов фиксированные НСК отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) с 0.2% бычьего сывороточного альбумина (БСА), супернатант удаляли, ресуспендировали клетки в 100 мкл того же буфера и добавляли антитела. После окончания инкубации клетки трижды отмывали ФСБ, содержащим 0.2% БСА, суспендировали в том же буфере и анализировали флуоресценцию клеток на проточном цитофлуориметре. Для окрашивания клеток антителами

к внутриклеточным антигенам клетки после фиксации пермеабилizировали 0.3%-ным раствором тритона X-100 в ФСБ, содержащем 2% БСА, в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем добавляли антитела и инкубировали 1 ч при комнатной температуре без доступа света. После окончания инкубации клетки трижды отмывали ФСБ, содержащим 0,1% тритона и 2% БСА, осадок клеток ресуспендировали в ФСБ, содержащим 0,2% БСА, и анализировали флуоресценцию клеток на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur, оснащенный аргоновым лазером с длиной волны 488 нм (Ресурсный центр клеточной и молекулярной биологии НИЦ “Курчатовский институт”). В каждом образце анализировали 10^4 клеток.

Для получения КС НСК на 16–20 пассажах высеивали по 5×10^5 в чашки Петри диаметром 6 см² и культивировали в виде нейросфер, КС для выделения экзосом собирали через 48 ч культивирования и центрифугировали 10 мин при $300 \times g$ при 4°C для удаления клеток на центрифуге Elmi Sky Line CM-6M (ELMI Ltd., Латвия).

МСК выделяли из жировой ткани мышей линии C57BL/6 в возрасте 2-х месяцев, как описано ранее [24]. Фрагменты жировой ткани измельчали ножницами, затем гомогенизировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США) без сыворотки. К суспензии фрагментов жировой ткани в среде добавляли раствор коллагеназы (Sigma, США) в конечной концентрации 0.08% и инкубировали суспензию при перемешивании 1 ч при 37°C. Собирали клетки с помощью центрифугирования (1200 об/мин , 10 мин). Осадок клеток ресуспендировали в среде DMEM/F12 с 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone, США) для нейтрализации коллагеназы, собирали клетки с помощью центрифугирования (1200 об/мин , 10 мин), ресуспендировали в среде DMEM/F12 с 10% ФБС и 50 мкг/мл гентамицина (Gibco, США) и переносили в культуральный флакон площадью 75 см² (Corning, США). После прикрепления (через 24 ч) клетки промывали ФСБ (Sigma, США), вносили культуральную среду и культивировали до достижения субконфлюентного состояния при 37°C, 5% CO₂ в увлажненной атмосфере. По достижении 80–85% конфлюентности клетки рассеивали, используя раствор трипсин-ЭДТА (Gibco, США), содержащий 0,05% трипсина и 0,02% ЭДТА. Полученные МСК характеризовали по экспрессии специфических антигенов. Для этого МСК ресуспендировали в ФСБ, содержащем 0,1% БСА, инкубировали 30 мин при комнатной температуре с антителами, конъюгированными с AlexaFluor 488 или фикоэритрином (Biolegend, США), к антигенам мыши Sca-1, CD9, CD45 и CD11b. В качестве изотипического контроля использовали соответствующие IgG, конъюгированные с AlexaFluor 488 или фикоэритрином (Biolegend, США). Клетки фиксировали в растворе

2%-ного параформальдегида 20 мин при комнатной температуре и анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur, оснащенный аргоновым лазером с длиной волны 488 нм (Ресурсный центр клеточной и молекулярной биологии НИЦ “Курчатовский институт”). В каждом образце анализировали 10^4 клеток.

Для получения КС МСК из жировой ткани мыши культивировали в состоянии, близком к монослою, в среде α MEM в течение 48 ч с добавлением 5% ФБС, предварительно очищенной от экзосом путем ультрацентрифугирования при $110000 \times g$ в течение 2 ч при 4°C. КС собирали и центрифугировали 10 мин при $300 \times g$ при 4°C для удаления клеток на центрифуге Elmi Sky Line CM-6M (ELMI Ltd., Латвия).

Выделение экзосом из КС НСК и МСК мыши. Собранную КС центрифугировали 20 мин при $2000 \times g$ при 4°C для удаления крупных фрагментов клеток и апоптотических телец. Полученную надосадочную жидкость фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0,22 мкм и центрифугировали при $10000 \times g$ в течение 30 мин на центрифуге Avanti J-E (Beckman Coulter, США, ротор JA-25) при 4°C. Надосадочную жидкость собирали и хранили до выделения экзосом при -80°C , затем размораживали и выделяли экзосомы с помощью двойного ультрацентрифугирования на высокоскоростной центрифуге Optima MAX-XP (Beckman Coulter, США, ротор MLA-55) при $110000 \times g$ в течение 2 ч при 4°C. Полученный осадок ресуспендировали в 1 мл ФСБ. Полученную после ультрацентрифугирования фракцию экзосом концентрировали с помощью ультрафильтрации с использованием концентраторов Amicon Ultracel YM-30 (30k MWCO, объем 0.5 мл; Merck Millipore, США) и Spin-X UF 500 (100k MWCO, объем 0.5 мл; Corning, Великобритания). Аликвоты по 100 мкл хранили при -80°C для дальнейших исследований. Концентрацию белка в образцах определяли спектрофотометрически с использованием набора BSA (Bicinchoninic acid protein assay kit, Sigma-Aldrich, США).

Характеристика морфологии и размера экзосом с помощью электронной микроскопии. Для исследования морфологии экзосом, полученных из КС НСК и МСК, применяли метод криогенной просвечивающей электронной микроскопии (крио-ПЭМ), как описано ранее [21]. Образцы анализировали с помощью крио-ПЭМ Titan Krios 60–300 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенного высокочувствительным детектором электронов Falcon II (Thermo Fisher Scientific, США) и корректором сферической aberrации Cs изображения (Image corrector, CEOS, Германия) в ресурсном центре зондовой и электронной микроскопии КК НБИКС-ПТ НИЦ “Курчатовский институт”. Экспериментальные данные получены при ускоряющем напряжении 300 кВ с использованием

программного обеспечения EPU (Thermo Fisher Scientific, США) в режиме малых доз при увеличениях 3800x, 18000x и 37000x и дефокусировке в диапазоне $[-2.0; -18.0]$ мкм. Авторы приносят благодарность сотрудникам ресурсного центра зондовой и электронной микроскопии Е. В. Ястремскому и Р. А. Камышинскому за проведение исследований с использованием крио-ПЭМ.

Определение размера экзосом с помощью метода динамического светорассеяния. Средний размер экзосом определяли методом динамического светорассеяния на анализаторе размера частиц и зета-потенциала Malvern Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical, Великобритания). Для каждого образца проводили не менее трех повторных измерений, данные усредняли.

Характеристика экзосом по экспрессии специфических маркеров с помощью проточной цитометрии. Для анализа специфических маркеров экзосом с помощью проточной цитометрии экзосомы инкубировали с альдегид-сульфатными латексными частицами диаметром 4 мкм (Invitrogen, США) в соотношении 1:9. К 5 мкл суспензии латексных частиц добавляли 45 мкл суспензии экзосом в ФСБ и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего добавляли 1 мл ФСБ и инкубировали еще 2 ч при комнатной температуре при перемешивании на шейкере. Далее латексные частицы с адсорбированными на них экзосомами осаждали центрифугированием ($3000 \times g$, 5 мин), осадок ресуспендировали в 100 мкл 100 ммоль/л раствора глицина и инкубировали в течение 30 мин для нейтрализации свободных альдегидных групп на частицах. Для контроля неспецифического связывания все те же экспериментальные процедуры повторяли с ФСБ, предварительно очищенной от экзосом путем ультрацентрифугирования. Далее частицы отмывали ФСБ от глицина и инкубировали с моноклональными антителами к маркерам экзосом CD9, конъюгированными с фикоэритрином (CD9-PE, BioLegend, США) и CD63, конъюгированными с аллофикоцианином (CD63-APC, BioLegend, США), в ФСБ, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина. При окрашивании экзосом неконъюгированными моноклональными антителами к TSG101 (TSG101-4A10, Invitrogen, США) использовали вторичные антитела, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (IgG-Alexa Fluor 488, Poly4053, BioLegend, США). Инкубацию проводили в течение ночи при 4°C (CD9, CD63) или в течение 45 мин при комнатной температуре (TSG101) на шейкере, после чего образцы дважды отмывали ФСБ и анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSAria Fusion (BD Biosciences, США) (Ресурсный центр клеточной и молекулярной биологии НИЦ “Курчатовский институт”).

Окрашивание экзосом красителем RKN26. Окрашивание экзосом НСК и МСК флуоресцентным

красителем RKN26 проводили в соответствии с инструкцией производителя (Sigma-Aldrich, США). Осадок экзосом каждого типа ресуспендировали в 500 мкл разбавителя С. В отдельном эппендорфе 500 мкл разбавителя С смешивали с 2 мкл RKN26. Суспензию экзосом смешивали с раствором красителя и инкубировали в течение 5 мин. Реакцию останавливали добавлением равного объема 1%-ного бычьего сывороточного альбумина. Меченые экзосомы собирали при ультрацентрифугировании при $110000 \times g$ в течение 60 мин, промывали ФСБ и собирали при ультрацентрифугировании.

Анализ локализации экзосом НСК и МСК в головном мозге мыши. Работа проведена на 9-ти самцах мышей линии C57Bl/6 в возрасте 2-х месяцев, весом 18–21 г (ФГБУН НЦБМТ ФМБА питомник “Столбовая”, Россия). Все эксперименты с животными проводили в соответствии с требованиями этического комитета НИЦ “Курчатовский институт”. Мыши содержались по 4–5 особей в клетках в стандартных условиях вивария со смешанной темной и светлой фаз суток 12/12 ч при свободном доступе к пище и воде. Животные были разделены на 3 группы. Первой двукратно в течение 2 дней интраназально вводили в каждую ноздрю по 5 мкл ФСБ (группа 1 – “контрольная группа”, $n = 3$), второй – суспензию флуоресцентно меченых красителем RKN26 экзосом НСК (группа 2), а третьей – экзосом МСК (группа 3) в ФСБ. Экспериментальные группы 2 и 3 получали по 5 мкл суспензии окрашенных RKN26 экзосом НСК или МСК в каждую ноздрю, по 5 мкг по белку на мыш ($n = 3$). Через 24 ч после последнего введения мышей анестезировали с использованием смеси золетил (Virbac Sante Animale, Франция) и рометар (Bioveta, Чешская Республика). Объем внутримышечной инъекции составлял 0.1 мл на 10 г веса животного. Через 10 мин мышей подвергали транскраниальной перфузии, которую проводили с помощью перистальтического насоса Ecoline ISM1090 (Ismatec, Швейцария) сначала холодным ФСБ (pH 7.4; Sigma-Aldrich, США) при комнатной температуре, затем 4%-ным раствором параформальдегида (Sigma-Aldrich, США) в ФСБ, и извлекали мозг. Для иммуногистохимического анализа головной мозг животных фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в ФСБ при 4°C в течение 24 ч. На вибраторе Leica VT1200S (Leica, Германия) готовили парасагитальные срезы толщиной 50 мкм. Плавающие срезы мозга контрольных мышей и мышей, которым интраназально вводили экзосомы НСК и МСК, окрашенные RKN26, помещали в 12-луночные планшеты с ФСБ и инкубировали в растворе с 300 ммоль/л DAPI в течение 20 мин в темноте при комнатной температуре. Отмывали ФСБ 3 раза по 15 мин. Срезы мозга заключали под покровные стекла с использованием маунтинга Fluoromount (Sigma-Aldrich, США).

Флуоресцентные срезы оцифровывали с помощью конфокального микроскопа FluoView 10i (Olympus, Япония). Для обработки и анализа полученных изображений срезов мозга использовали программный пакет Imaris 7.4.2 (Bitplane, Швейцария).

Индукция дифференцировки НСК в нейроны и астроциты и культивирование с флуоресцентно меченными экзосомами НСК и МСК. Дифференцировку НСК проводили на стеклах, предварительно покрытых раствором Geltrex. НСК высаживали в плотности 20 тыс. клеток/см² (40 тыс. клеток/лунку) в стандартной среде (0.5 мл/лунку). Через 2 сут для индукции дифференцировки культуральную среду заменяли средой Neurobasal A, содержащей 2% B27 и 5 нг/мл bFGF. Еще через 2 сут удаляли bFGF. Каждые 2 сут половину объема культуральной среды заменяли свежей средой того же состава. Через 6 сут дифференцировки (8 сут после посева на стекла) к дифференцированным в нейроны и астроциты клеткам и недифференцированным НСК, которые высаживали на стекла за 24 ч до внесения экзосом, добавляли флуоресцентно меченные красителем РКН26 экзосомы НСК и МСК (5 мкг/мл). Через 24 ч клетки фиксировали 4%-ным параформальдегидом с 4%-ной сахарозой в течение 20–30 мин при комнатной температуре. После этого фиксированные клетки окрашивали антителами к маркерам дифференцировки нейронов (β -тубулин III) и астроцитов (GFAP). Клетки пермеабелизовали 0,3%-ным раствором тритона X-100 в ФСБ, содержащем 0,5% бычьего сывороточного альбумина, в течение 1 ч при комнатной температуре и инкубировали с конъюгированными антителами к β -тубулину III (клон TUJ1, BioLegend, США) и GFAP (поликлональные антитела куриные, Poly28294, BioLegend, США) в течение ночи при 4°C. После инкубации с антителами стекла с клетками трижды промывали промывочным буфером, добавляли вторичные антитела, конъюгированные с Alexa Fluor 488 (поликлональные козы антимышинные антитела IgG-Alexa Fluor 488, Poly4053, BioLegend, США) для окрашивания нейронов и вторичные антитела, конъюгированные с красителем Cy2 (поликлональные ослиные антитела к куриному IgY (IgG), Polyclonal AB 2340370 Jackson ImmunoResearch, Великобритания) для окрашивания астроцитов, после чего инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Ядра окрашивали DAPI (1 мкг/мл) в течение 15 мин, отмывали и монтировали на предметные стекла с помощью фиксирующей жидкости ProLong Diamond (Invitrogen, США) и высушивали в течение ночи. Препараты исследовали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM900 (Carl Zeiss, Германия). Фотографировали не менее 10 случайных полей зрения с использованием двух объективов: 20 \times и 63 \times с иммерсией (Ресурсный центр

клеточной и молекулярной биологии НИЦ “Курчатовский институт”) и подсчитывали по фотографиям общее число клеток по ядрам, число клеток с экзосомами и число экзосом на клетку (на НСК, нейрон или астроцит), после чего рассчитывали долю клеток каждого типа с экзосомами, среднее число экзосом на клетку и среднее число экзосом на клетку с экзосомами.

Облучение клеток. НСК облучали в суспензии в культуральной среде на холоде в пробирках на 2 мл на установке “ГУТ-200М” (кобальт-60) при мощности дозы 0,5 Гр/мин в дозе 4 Гр.

Анализ уровня апоптоза и распределения клеток по фазам клеточного цикла. Контрольные и облученные НСК на 16–20 пассажах высеивали по 5×10^5 в чашки Петри диаметром 6 см² и культивировали в виде прикрепляющейся культуры. Часть контрольных и облученных НСК культивировали в присутствии экзосом НСК или МСК, которые через 30 мин после облучения вносили в конечной концентрации 5 мкг/мл. Клетки собирали через 24 ч после облучения, промывали ФСБ, фиксировали 70%-ным этанолом при +4°C в течение 1 ч, используя 1 мл раствора этанола на 1×10^6 клеток, и хранили при –20°C в этом же фиксирующем растворе до исследования. Фиксированные клетки осаждали центрифугированием при 700 g, промывали ФСБ, ресуспендировали в концентрации 1×10^6 клеток/мл в растворе для окрашивания ДНК (ФСБ pH 7.4, содержащий 0.1% тритона X-100, 0.1 моль/л ЭДТА, 0.05 мг/мл рибонуклеазы А, 50 мкг/мл йодистого пропидия) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Исходный раствор рибонуклеазы А предварительно кипятили на водяной бане в течение 10 мин для удаления возможной примеси дезоксирибонуклеаз. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла и клеток, находящихся в состоянии апоптоза, проводили с помощью проточного цитофлуориметра FACSAria при длине волны возбуждения 488 нм и эмиссии 585 ± 42 нм (Ресурсный центр клеточной и молекулярной биологии НИЦ “Курчатовский институт”). Долю апоптотических клеток оценивали как долю гиподиплоидных клеток.

Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента с использованием компьютерных программ OriginPro (OriginLab Corporation) и Microsoft Excel (Microsoft Corporation, США). Статистически значимыми считали результаты при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

НСК и МСК из жировой ткани мыши, использованные для получения КС для выделения экзосом, характеризовали по экспрессии набора маркерных антигенов, специфичных для этих

Таблица 1. Характеристика препаратов НСК и МСК мыши, использованных для получения кондиционированной среды для выделения экзосом

Маркер	Доля клеток, экспрессирующих соответствующий антиген, %
НСК	
Маркер стволовых клеток нестин	86,0 ± 2
Маркер дифференцировки нейронов β-тубулин III	4,0 ± 1,5
Маркер дифференцировки астроцитов GFAP	4,8 ± 1,5
Маркер дифференцировки олигодендроцитов O4	4,1 ± 1,5
Маркер дифференцировки предшественников олигодендроцитов NG2	1,3 ± 0,5
Маркер нейральных прогениторных клеток, белок плазматической мембраны СК–проминин-1 (CD133)	2,6 ± 0,5
МСК	
Маркер стволовых клеток Sca-1	94,9 ± 1,0
Маркер МСК белок семейства тетраспанинов CD9	95,9 ± 1,5
Маркер миелоидных клеток CD45	Отсутствует
Маркер миелоидных клеток CD11b	Отсутствует

стволовых клеток. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Представленные в табл. 1 результаты позволяют заключить, что по набору поверхностных маркеров использованные для приготовления КС для получения экзосом культуры клеток полностью соответствуют характеристикам НСК и МСК соответственно.

Характеристика препаратов экзосом, полученных из КС НСК и МСК, представлена на рис. 1. Приведенные результаты позволяют заключить, что препараты экзосом стволовых клеток, полученные из КС НСК и МСК мыши для проведения исследования, полностью соответствовали параметрам, описанным ранее [21]: они имели характерную округлую форму и двойную мембрану по данным крио-ПЭМ (рис. 1, а, д), средний размер экзосом НСК по данным динамического светорассеяния составил 50.8 ± 0.1 нм, а МСК – 68.1 ± 3.8 нм (рис. 2, б, е). По данным проточной цитометрии практически все экзосомы были положительны по маркерам CD9/CD63 и TSG101 (рис. 1, в, г, ж, з). Совокупность представленных данных позволяет заключить, что полученные и использованные в дальнейших экспериментах экстракционные микровезикулы соответствуют всем требованиям, предъявляемым к экзосомам.

Исследование накопления экзосом НСК и МСК в головном мозге мышей. Для исследования накопления и анализа локализации экзосом НСК и МСК мыши в коре и гиппокампе головного мозга интактных животных им интраназально ежедневно раз в день в течение 2 сут вводили препараты

экзосом, окрашенных флуоресцентным красителем РКН26. Через 24 ч животных подвергали эвтаназии, извлекали мозг, готовили препараты мозга, окрашивали ядра клеток красителем DAPI и проводили исследование образцов с помощью флуоресцентной микроскопии. Полученные результаты представлены на рис. 2 и рис. 3.

Показано, что при интраназальном введении мышам окрашенные красителем РКН26 экзосомы НСК мышей проникают в головной мозг (см. рис. 2) и через 24 ч после введения регистрируются в коре головного мозга и гиппокампе (рис. 2, б, г) и локализуются в перинуклеарной области клеток по границе ядер, окрашенных красителем DAPI (рис. 2, в, д).

Аналогичные данные по накоплению экзосом в мозге были получены при интраназальном введении мышам экзосом МСК мыши (см. рис. 3).

Как следует из представленных на рис. 3 данных, МСК мыши, окрашенные РКН26, так же как и экзосомы НСК, через 24 ч после интраназального введения обнаруживались и в коре и гиппокампе мышей и локализовались в перинуклеарной области клеток мозга. Полученные результаты свидетельствуют об эффективной доставке экзосом НСК и МСК в головной мозг мышей при интраназальном введении этих микровезикул, их проникновении в часть клеток гиппокампа и коры и локализации в клетках мозга в прилегающей к клеточному ядру области.

Для исследования накопления и локализации экзосом НСК и МСК в клетках мозга разных типов было изучено взаимодействие экзосом

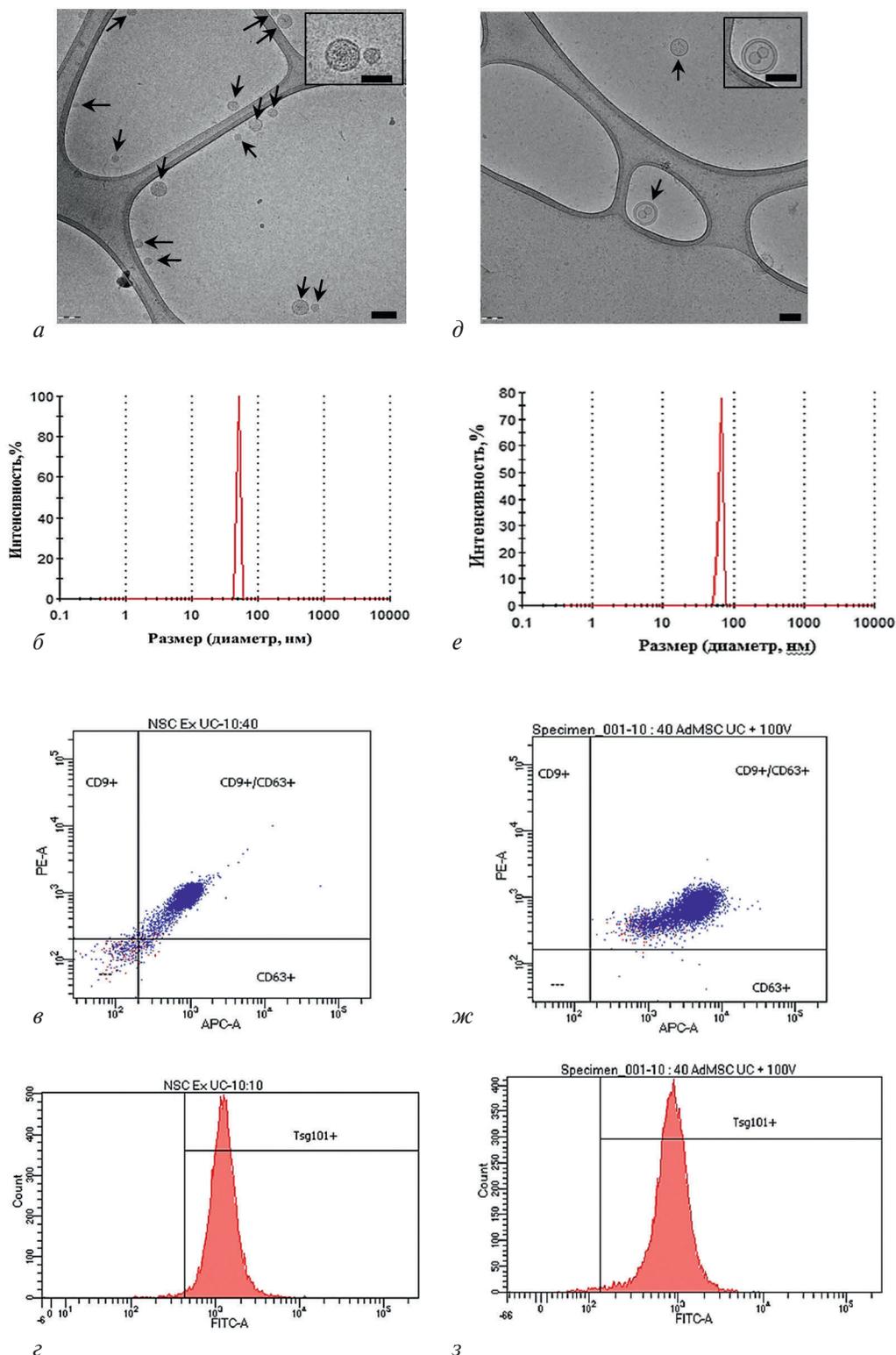


Рис. 1. Характеристика экзосом, выделенных из культуральной среды, кондиционированной НСК (*a – z*) и МСК (*e – з*); *a, d* – морфология экзосом, данные крио-ПЭМ, масштабный отрезок – 100 нм; *б – e* – распределение экзосом по размеру по данным динамического светорассеяния; *в, ж* – экспрессия маркеров CD9/CD63 при двойном окрашивании экзосом антителами к указанным маркерам; *з, з* – экспрессия маркера TSG101 по данным проточной цитометрии.

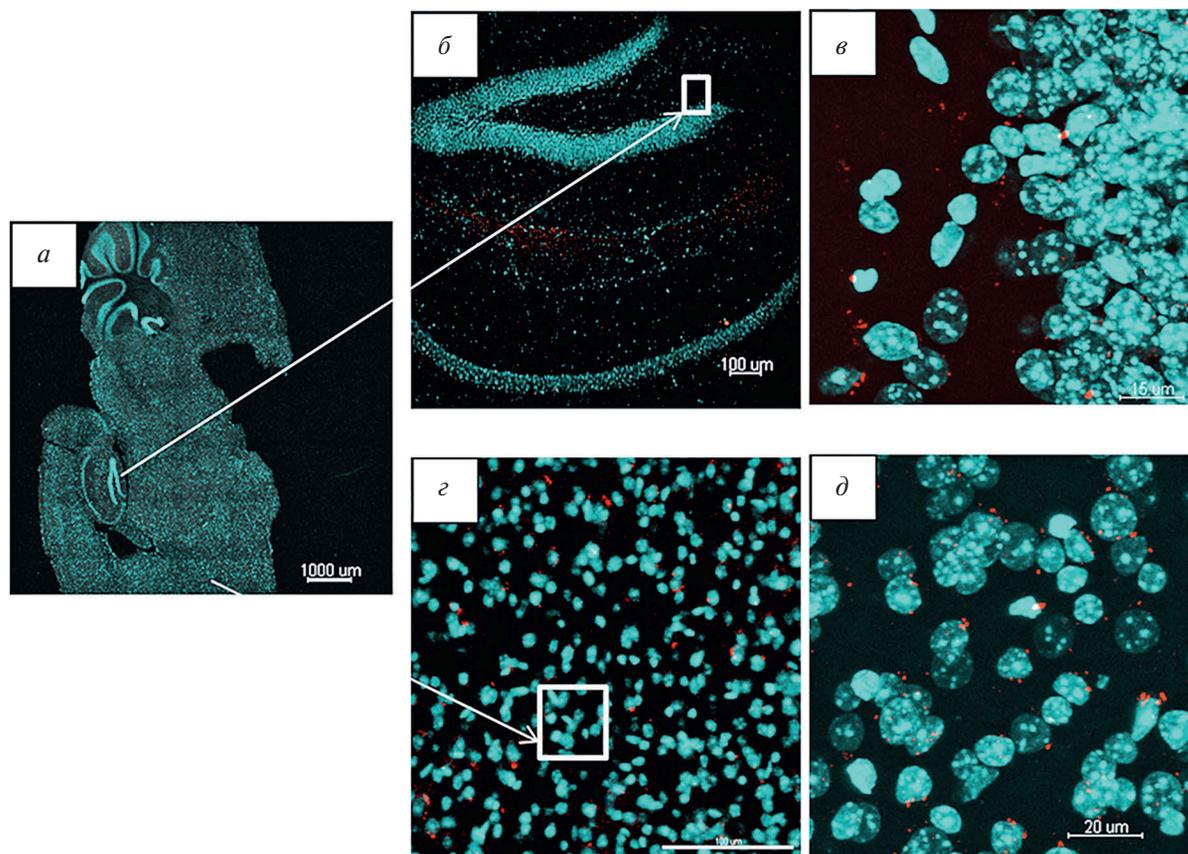


Рис. 2. Микрофотографии препаратов головного мозга мыши через 24 ч после интраназального введения экзосом НСК мыши. Меченные красителем РКН26 экзосомы (красный) НСК мыши визуализировали на парасагитальных срезах мозга (*a*) для обнаружения их присутствия в гиппокампе (*б, в*) и коре (*г, д*). Z-stacks с увеличением $20\times$ (*б, г*) и $60\times$ (*в, д*). Ядра окрашены DAPI (голубой).

с культивируемыми НСК, а также с нейронами и астроцитами, дифференцированными из культивируемых НСК мыши. В культивируемых НСК экзосомы, выделенные и из КС НСК, и из КС МСК и окрашенные красителем РКН26, визуализировались по периферии ядер НСК, окрашенных красителем DAPI (рис. 4).

Присутствие экзосом НСК и МСК в нейронах обнаруживали лишь в небольшом числе клеток, их локализация также соответствовала перинуклеарной области тела нейронов (рис. 5). В отростках нейронов экзосомы обнаружены не были.

Накопление экзосом НСК и МСК в астроцитах, особенно экзосом НСК, обнаруживали в большем числе клеток, чем при исследовании их накопления в нейронах (см. рис. 5). В астроцитах, так же как и в других клетках, экзосомы располагались по границе ядер, и, кроме того, в цитоплазме клеток (см. рис. 5). При этом в астроцитах были хорошо видны окрашенные крупные везикулы, по-видимому, эндосомы, содержащие окрашенные РКН26 экзосомы, что позволяет предполагать, что

интернализация экзосом в этих клетках осуществляется по механизму эндоцитоза.

Количественные данные по особенностям накопления экзосом НСК и МСК в культивируемых клетках мозга мыши представлены в табл. 2.

Показано, что через 24 ч после добавления флуоресцентно меченных экзосом НСК в концентрации 5 мкг/мл к культуре клеток НСК доля клеток с экзосомами была достоверно выше после добавления экзосом МСК ($p < 0.05$). При этом среднее число экзосом на клетку было близким для экзосом НСК и экзосом МСК. Среднее число экзосом на НСК с экзосомами составило 3.2 ± 0.3 после культивирования с экзосомами НСК и 2.3 ± 0.2 после культивирования с экзосомами МСК. Таким образом, в НСК экзосомы МСК накапливались большим числом клеток, но среди НСК с экзосомами более высокое число экзосом наблюдали при культивировании НСК с экзосомами НСК.

При культивировании экзосом НСК и МСК с нейронами и астроцитами, дифференцированными из НСК, в той же концентрации через 24 ч

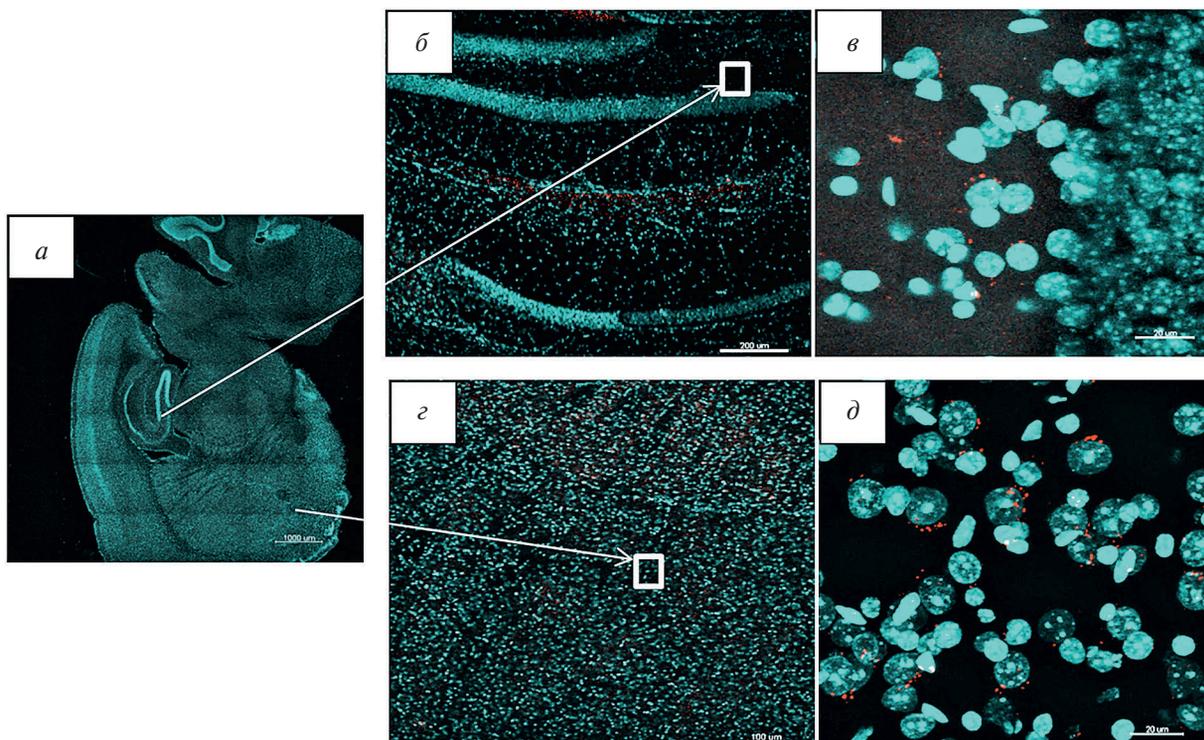


Рис. 3. Микрофотографии головного мозга мыши через 24 ч после интраназального введения экзосом МСК мыши. Меченные красителем РКН26 экзосомы (красный) МСК мыши визуализировали на парасагитальных срезах мозга (а) для обнаружения их присутствия в гиппокампе (б, в) и коре (г, д). Z-stacks с увеличением 20× (б, г) и 60× (в, д).

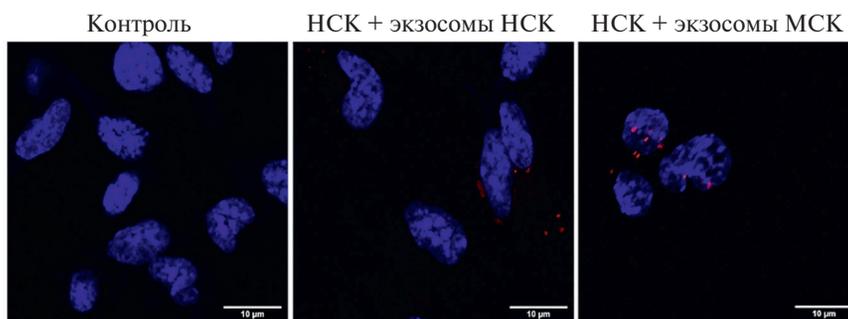


Рис. 4. Микрофотографии культуры НСК мыши через 24 ч культивирования без (контроль) и в присутствии экзосом НСК и МСК, меченных красителем РКН26, увеличение 63×. Ядра окрашены DAPI (голубой).

культивирования доля нейронов с экзосомами МСК также была более высокой, чем при культивировании с экзосомами НСК. Число экзосом на нейрон также было достоверно более высоким при добавлении экзосом МСК.

Доля астроцитов с экзосомами НСК и МСК была одинакова, но накопление экзосом на клетку было достоверно более высоким при культивировании клеток с экзосомами НСК, чем при культивировании с экзосомами МСК.

Анализируя данные табл. 2, необходимо также отметить, что исследованные типы клеток мозга в равной мере накапливали экзосомы МСК, а экзосомы НСК наиболее активно накапливались астроцитами, в то время как нейроны накапливали экзосомы НСК наименее активно.

Таким образом, накопление экзосом МСК в разных типах клеток мозга происходит с близкой эффективностью, в то время как накопление экзосом НСК различалось для разных типов клеток

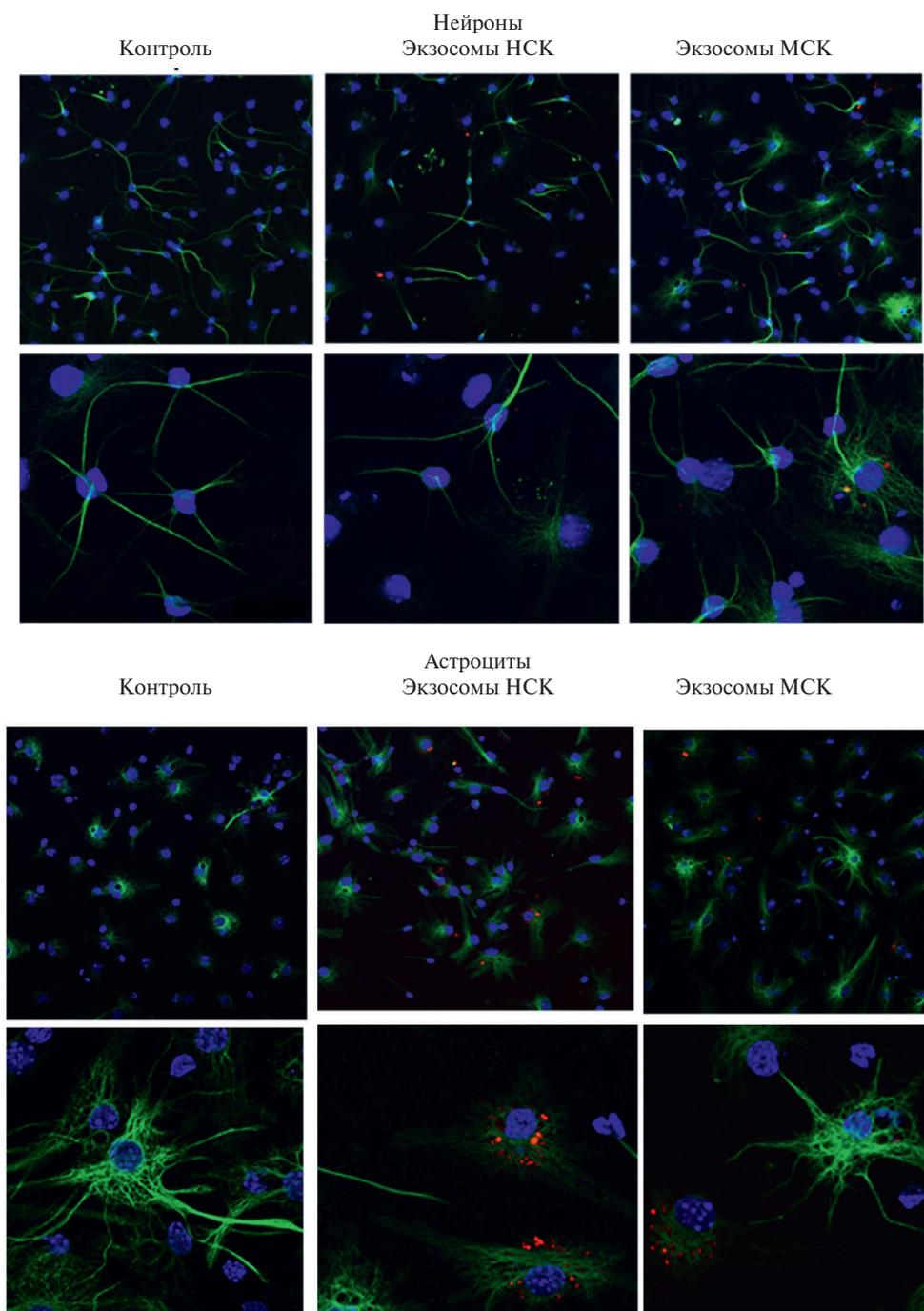


Рис. 5. Микрофотографии культуры нейронов и астроцитов через 24 ч культивирования без (контроль) и в присутствии экзосом НСК и МСК, меченных красителем РКН26. Для микрофотографий нейронов и астроцитов увеличение: верхний ряд – 20×, нижний – 63×. Нейроны и астроциты получены при дифференцировке из НСК мыши. Зеленое окрашивание на микрофотографиях нейронов соответствует маркеру нейронов белку бета-тубулину III, а на микрофотографиях астроцитов – маркеру астроцитов белку GFAP. Ядра окрашены DAPI (голубой).

мозга и наиболее активным было в астроцитах, а минимальным в нейронах.

Экзосомы стволовых клеток могут регулировать активность клеток головного мозга и оказывать

защитное влияние при действии ряда повреждающих факторов. Поэтому далее было изучено влияние исследуемых микровезикул на параметры клеточного цикла и уровень апоптоза НСК при

Таблица 2. Количественный анализ накопления экзосом НСК (эНСК) и МСК (эМСК) в культивируемых клетках мозга мышей. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего, для всех групп $n = 10$.

Тип клеток	Доля клеток, %		Среднее число экзосом на клетку, шт.		Среднее число экзосом на клетку для клеток с экзосомами, шт.	
	с эНСК	с эМСК	с эНСК	с эМСК	с эНСК	с эМСК
НСК	28,3 \pm 1,7	38,2 \pm 0,1*	0,8 \pm 0,2	0,6 \pm 0,1	3,2 \pm 0,3	2,3 \pm 0,2*
Нейроны	11,2 \pm 1,9#	33,7 \pm 8,4*	0,2 \pm 0,0#	1,0 \pm 0,2*	2,0 \pm 0,3#	2,7 \pm 0,6
Астроциты	41,1 \pm 4,7	37,2 \pm 3,8	5,1 \pm 0,7	1,3 \pm 0,2*	8,4 \pm 1,3	3,5 \pm 0,4*

* – отличия между показателями доли клеток с эНСК и с эМСК и для числа эНСК и эМСК на клетку статистически значимы, $p < 0.05$; # – отличия показателя для нейронов от НСК и астроцитов статистически значимы, $p < 0.05$.

действию облучения. Полученные результаты представлены на рис. 6.

Показано, что облучение культуры НСК в дозе 4 Гр через 24 ч сопровождалось накоплением клеток в фазе G_0/G_1 и снижением их количества в фазах S и G_2/M , что свидетельствует о блоке прохождения клеточного цикла в фазе G_0/G_1 через 24 ч после облучения (рис. 6, а, б). Культивирование облученных в дозе 4 Гр НСК в присутствии экзосом и НСК, и МСК в течение 24 ч не приводило к изменению параметров клеточного цикла облученных НСК.

При анализе уровня апоптоза НСК, выявляемого по доле гиподиплоидных клеток, было обнаружено увеличение количества клеток в состоянии апоптоза с $1.4 \pm 0.1\%$ до $5.9 \pm 0.7\%$ через 24 ч после облучения НСК в дозе 4 Гр. Культивирование облученных НСК в присутствии экзосом НСК приводило к статистически значимому снижению уровня апоптоза до $3.7 \pm 0.5\%$ ($p = 0.04$), а в присутствии экзосом МСК – только к незначительному снижению уровня апоптоза до $4.5 \pm 0.7\%$ соответственно, который, однако, при действии и экзосом НСК, и экзосом МСК оставался выше уровня контроля (рис. 6, а – г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенное исследование позволило показать, что при интраназальном введении мышам препаратов гомологичных экзосом – экзосом НСК и МСК мыши – эти экстраклеточные микровезикулы через 24 ч после введения обнаруживаются в головном мозге и коре, и в гиппокампе – в тех областях мозга, которые связаны с выполнением когнитивных функций. Полученные данные о быстром появлении экзосом СК в разных отделах мозга подтверждают способность этих микровезикул эффективно преодолевать гематоэнцефалический барьер. Следует отметить, что при терапевтическом использовании экзосом для снижения/предупреждения развития пострadiационного

нейровоспаления и нарушения когнитивных функций после облучения головы мышей введение экзосом продолжали длительно – в течение 4-х недель по 2–3 раза в неделю с интервалом 1–2 дня между введениями [22]. Учитывая полученные результаты о поступлении экзосом в мозг, можно заключить, что такая схема введения обеспечивала длительное воздействие биологически активных веществ, транспортируемых экзосомами СК, на клетки мозга облученных животных, в том числе в отдаленный период, когда развиваются нейродегенеративные осложнения, обусловленные развитием нейровоспаления, что и обеспечивало предупреждение развития патологии.

В модельных экспериментах, выполненных на культивируемых клетках мозга – НСК и дифференцированных из НСК нейронах и астроцитах, – показано, что в культуре эти клетки накапливают экзосомы, которые обнаруживаются в перинуклеарной области клеток. Ранее нами было показано аналогичное накопление экзосом СК в перинуклеарной области культивируемых клеток микроглии [25].

В литературе обсуждается, по крайней мере, два механизма переноса экзосом в клетки-мишени. С одной стороны, допускается возможность слияния двуслойной мембраны экзосом с мембраной клетки, с другой стороны, рассматривается процесс переноса экзосом в клетки в результате эндоцитоза этих микровезикул. Последний механизм получил подтверждение в исследовании, выполненном Т. Тянь и соавторами с использованием прижизненной микроскопии на клетках феохромоцитомы крыс линии PC12 – клеток нейронального происхождения, – в котором было показано, что экзосомы интернализируются клетками по механизму эндоцитоза, обнаруживаются в эндоцитарных везикулах и транспортируются ими в перинуклеарную область клеток [26]. Полученные нами данные о локализации экзосом в культивируемых клетках мозга разных типов в перинуклеарной области клеток, полностью коррелируют с представленными

в этой работе результатами и позволяют полагать, что транслокация экзосом СК в клетки мозга происходит в результате их эндоцитоза. В астроцитах показано образование напоминающих эндосомы крупных везикул, окрашенных РКН26, и в цитоплазме, и в перинуклеарной области клеток.

Защитное действие экзосом СК разного происхождения продемонстрировано при использовании разных моделей, в том числе при облучении в процессе лучевой терапии для снижения повреждения нормальных тканей [27]. Механизм защитного действия экзосом связывают с регуляцией пролиферации облученных клеток и снижением их гибели. Защитное действие экзосом МСК от апоптоза, вызванного окислительным стрессом, показано в первичной культуре нейронов [28]. В этой же работе авторы показали возможность стимуляции ремиелинизации нейронов с помощью экзосом после демиелинизации клеток лизофосфатидилхолином. В настоящей работе через 24 ч после культивирования облученных в дозе 4 Гр НСК в присутствии экзосом не было обнаружено восстановления пострадиационного блока клеточного цикла этих клеток. Однако было показано снижение уровня апоптоза НСК при культивировании облученных клеток в присутствии экзосом НСК и аналогичная тенденция к снижению уровня апоптоза НСК показана при действии экзосом МСК, что подтверждает представления о снижении гибели клеток по механизму апоптоза при действии экзосом. Следует отметить, что культура нейральных стволовых/нейральных прогениторных клеток характеризуется высокой радиочувствительностью: 50% клеток погибает через 7 сут после облучения культуры в дозе 1.2 Гр, а при дозе 4 Гр выживает только 10% клеток [23]. Поэтому даже незначительное снижение уровня апоптоза при этой дозе может иметь значение для повышения выживаемости НСК.

Ранее, кроме того, была показана возможность регуляции активности микроглии при действии экзосом НСК [25], что может определять еще один механизм действия экзосом НСК.

Экзосомы МСК, так же как и сами МСК, могут играть важную регуляторную роль в снижении уровня нейровоспаления, регулируя провоспалительную активность микроглии и макрофагов. Действительно, было показано снижение уровня экспрессии генов провоспалительных цитокинов в селезенке мышей при введении ЛПС и культивируемых клетках активированной ЛПС микроглии при действии экзосом МСК, но экзосомы НСК такой активностью не обладали [25].

В полученных в настоящей работе результатах показан перенос экзосом гомологичных СК в головной мозг мыши и их накопление в перинуклеарной области клеток мозга. Аналогичные

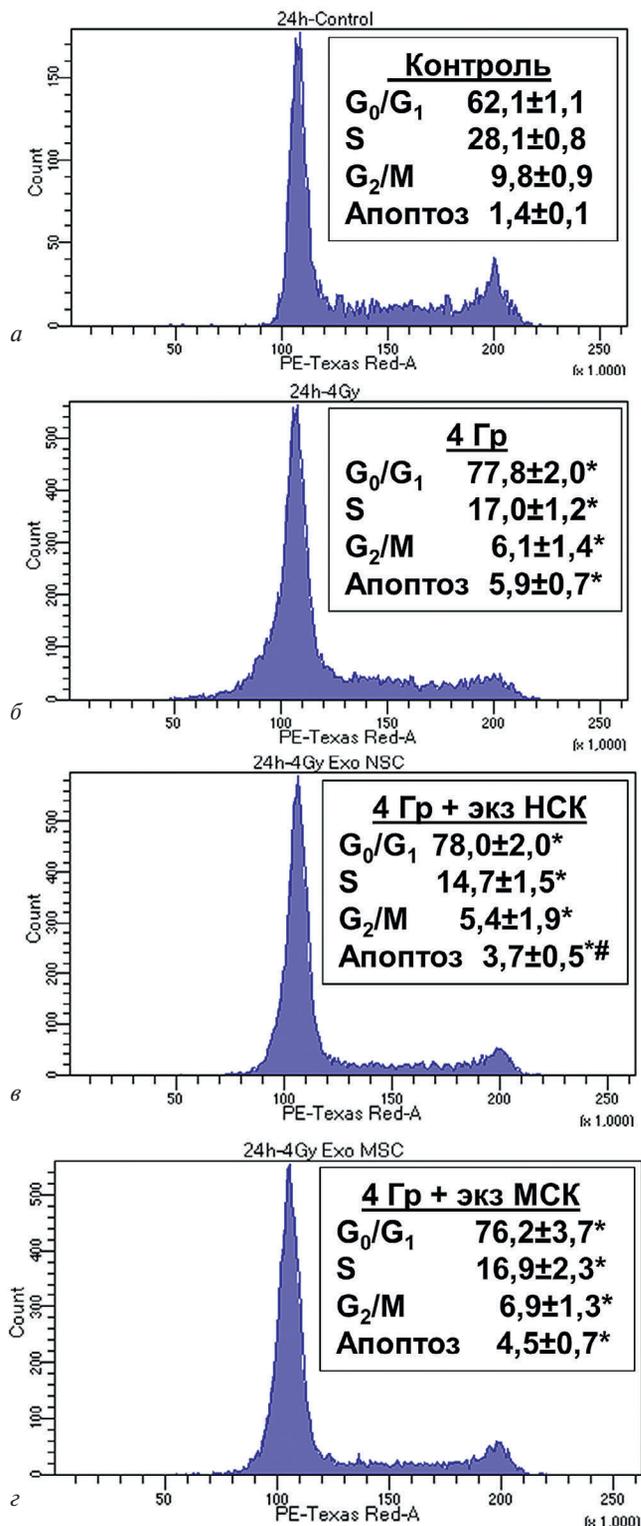


Рис. 6. Параметры клеточного цикла и уровень апоптоза контрольных (а) и облученных в дозе 4 Гр НСК (б) и НСК, которые после облучения культивировали в присутствии экзосом НСК (в) или МСК (г) мыши через 24 ч после воздействия.

результаты получены при исследовании локализации экзосом СК в культивируемых клетках мозга. Совокупность этих данных, безусловно, свидетельствует о важной регуляторной роли биологически активных веществ, транспортируемых экзосомами СК, в защитном действии экзосом и их способности стимулировать процессы регенерации.

Кроме того, накопление экзосом в мозге свидетельствует о возможности регуляции активности клеток головного мозга в результате лиганд-рецепторных взаимодействий между молекулами мембраны клеток мозга и мембраны экзосом, приводящих к активации специфических сигнальных каскадов. Эти механизмы остаются мало изученными, но могут быть наиболее эффективными при использовании гомологичных экзосом.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что механизмы стимуляции процессов регенерации с помощью экзосом СК после повреждения мозга разнообразны и реализуются, во-первых, по нескольким механизмам, а во-вторых, могут зависеть от происхождения экзосом и требуют дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Показано накопление экзосом, полученных из культуральной среды, кондиционированной НСК и МСК мышей линии C57BL/6, в гиппокампе и коре головного мозга при их интраназальном введении сингенным мышам. Локализовались экзосомы в перинуклеарной области клеток мозга.

2. Обнаружено, что при культивировании НСК, а также нейронов и астроцитов, полученных при дифференцировке НСК, с экзосомами НСК эти микровезикулы более интенсивно накапливаются в НСК и астроцитах и локализуются в перинуклеарной области клеток, а в астроцитах и цитоплазме.

3. Показано, что накопление экзосом МСК в разных типах клеток мозга происходит с близкой эффективностью, в то время как накопление экзосом НСК различалось для разных типов клеток мозга и наиболее активным было в астроцитах, а минимальным в нейронах.

4. Культивирование облученных в дозе 4 Гр НСК в присутствии экзосом как НСК, так и МСК мыши не приводит к восстановлению параметров клеточного цикла через 24 ч после воздействия, но обеспечивает снижение количества клеток в состоянии апоптоза при действии экзосом НСК, аналогичная тенденция наблюдается при действии экзосом МСК.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

НИЦ “Курчатовский институт”.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все манипуляции с животными были проведены с соблюдением требований, изложенных в директиве по охране животных, используемых в научных целях (2010/63/ EU от 22.09.2010), а также в соответствии с правилами, утвержденными комиссией по биоэтике НИЦ “Курчатовский институт” (протокол от 25.01.2023 № 02-2 пр).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yang L., Yang J., Li G., Li Y., Wu R., Cheng J., Tang Y. // *Molecular. neurobiology*. 2017. V. 54. № 2. P. 022–1032.
2. Raber J., Rola R., LeFevour A., Morhardt D., Curley J., Mizumatsu S., VandenBerg S.R., Fike J.R. // *Radiation research*. 2004. V. 162. № 1. P. 39–47.
3. Blurton-Jones M., Kitazawa M., Martinez-Coria H., Castello N.A., Muller F.J., Loring J.F., Yamasaki T.R., Poon W.W., Green K.N., LaFerla F.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 32. P. 13594–13599.
4. Acharya M.M., Christie L.A., Lan M.L., Giedzinski E., Fike J.R., Rosi S., Limoli C.L. // *Cancer Res*. 2011. V. 71. № 14. P. 4834–4845.
5. Joo K.M., Jin J.K., Kang B.G., Lee S.J., Kim K.H., Yang H., Lee Y.A., Cho Y.J., Im Y.S., Lee D.S., Lim D.H., Kim D.H., Um H.D., Lee S.H., Lee J.I., Nam D.H. // *PLoS. One*. 2012. V. 7. № 2. P. e25936.
6. Haus D.L., Lopez-Velazquez L., Gold E.M., Cunningham K.M., Perez H., Anderson A.J., Cummings B.J. // *Exp. Neurol*. 2016. V. 281. P. 1–16.
7. Laperle A., Alexandra V., Avalos P., Lu B., Wu A., Fulton A., Ramirez S., Garcia V.J., Bell Sh., Ho R., Lawless G., Roxas K., Shahin S., Shelest O., Svendsen S., Wang Sh., Svendsen C.N. // *Stem Cell Reports*. 2023. V. 18. № 8. P. 1629–1642.
8. Lopatina T., Kalinina N., Karagyaur M., Stambolsky D., Rubina K., Revischin A., Pavlova G., Parfyonova Y., Tkachuk V. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 3. P.e17899.
9. McLaughlin M.M., Marra K.G. // *Organogenesis*. 2013. V. 9. № 2. P. 79–81.
10. Su Y., Xu C., Cheng W., Zhao Y., Sui L., Zhao Y. // *Int. J. Mol. Sci*. 2023. V. 24. № 2. P. 1277.
11. Vogel A., Upadhyya R., Shetty A.K. // *EBioMedicine*. 2018. V. 38. P. 273–282.
12. Jin M., Zhang S., Wang M., Li Q., Ren J., Luo Y., Sun X. // *Front. Bioeng. Biotechnol*. 2022. V.10. P. 980548.
13. Cherian S.G., Narayan S.K., Arumugam M. // *Brain Res*. 2023. V. 1803. P. 148228.
14. Sun X., Jung J.H., Arvola O., Santoso M.R., Giffard R.G., Yang P.C., Stary C.M. // *Front Cell Neurosci*. 2019. V. 13. P. 394.

15. *Chen L.Y., Kao T.W., Chen C.C., Niaz N., Lee H.L., Chen Y.H., Kuo C.C., Shen Y.A.* // *Cells*. 2023. V. 12. № 7. P. 1018.
16. *Smith S.M., Giedzinski E., Angulo M.C., Lui T., Lu C., Park A.L., Tang S., Martirosian V., Ru N., Chmielewski N.N., Liang Y., Baulch J.E., Acharya M.M., Limoli C.L.* // *Stem Cells Transl Med*. 2020. V. 9. № 1. P. 93–105.
17. *Baulch J.E., Acharya M.M., Allen B.D., Ru N., Chmielewski N.N., Martirosian V., Giedzinski E., Syage A., Park A.L., Benke S.N., Parihar V.K., Limoli C.L.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. № 17. P. 4836–4841.
18. *Ioannides P., Giedzinski E., Limoli C.L.* // *J. Cancer Metastasis Treat*. 2020. V. 6. № 15.
19. *Liu M., Yang Y., Zhao B., Yang Y., Wang J., Shen K., Yang X., Hu D., Zheng G., Han J.* // *Front Cell Dev Biol*. 2021. V. 9. P. 693782.
20. *Forsberg M.H., Kink J.A., Hematti P., Capitini C.M.* // *Front. Cell Dev. Biol*. 2020. V. 8. P. 665.
21. *Ratushnyak M.G., Semochkina Y.P., Yastremsky E.V., Kamyshinsky R.A.* // *Bull. Exp. Biol. Med*. 2022. V.173. № 4. P. 544–552.
22. *Ratushnyak M.G., Zhirnik A.S., Smirnova O.D., Semochkina Y.P., Parfenova A.A., Goryunov K.V., Silachev D.N., Moskaleva E.Y.* // *Bull. Exp. Biol. Med*. 2022. V. 174. № 4. P. 571–577.
23. *Посыпанова Г.А., Ратушняк М.Г., Семочкина Ю.П., Абишева А.А., Москалева Е.Ю.* // *Цитология*. 2019. Т. 61. № 10. С. 806–816.
24. *Rodina A.V., Semochkina Y.P., Vysotskaya O.V., Glukhov A.I., Moskaleva E.Y.* // *Biol. Bull. Russ. Acad. Sci*. 2021. V. 48. P. 2060–2070.
25. *Ратушняк М.Г., Шапошникова Д.А., Высоцкая О.В.* Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 1 / Под ред. А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. Серпухов: Типография Пятый Формат, 2023. С. 283–289.
26. *Tian T., Wang Y., Wang H., Zhu Z., Xiao Z.* // *J. Cell. Biochem*. 2010. V. 111. № 2. P. 488–96.
27. *Nanduri L.S.Y., Duddempudi P.K., Yang W-L., Tamarat R., Guha C.* // *Front. Pharmacol*. 2021. V. 12. P. 662437.
28. *Farinazzo A., Turano E., Marconi S., Bistaffa E., Bazzoli E., Bonetti B.* // *Cytotherapy*. 2015. V. 17. № 5. P. 571–578.

Localization of the Stem Cells Exosomes in the Brain and in the Cultured Mouse Brain Cells

M. G. Ratushnyak¹, A. V. Rodina¹, D. A. Shaposhnikova¹, and E. Yu. Moskaleva¹

¹*NRC “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia*

The possibility of transferring exosomes of neural (NSC) and mesenchymal (MSC) mouse stem cells labeled with the fluorescent dye PKH26 into the cerebral cortex and hippocampus after their intranasal administration to mice, and the accumulation and localization of exosomes in cultured brain cells of various types, and also the effect of exosomes of NSCs and MSCs on the parameters of the cell cycle and the level of apoptosis of cultured NSCs after irradiation at a dose of 4 Gy. The accumulation of exosomes obtained from the culture medium of NSCs and MSCs from the adipose tissue of C57BL/6 mice was shown both in the hippocampus and in the cerebral cortex after their intranasal administration to syngeneic mice. Exosomes were found predominantly in the perinuclear region of brain cells. When culturing NSCs and differentiated from NSCs neurons and astrocytes, exosomes accumulate more intensively in astrocytes and are also localized in the perinuclear region of cells, and in astrocytes also in the cytoplasm. Exosomes accumulated most intensively in astrocytes. When studying the effect of stem cell exosomes on the cell cycle of irradiated NSCs, it was shown that the cultivation of NSCs irradiated at a dose of 4 Gy in the presence of exosomes of both NSCs and mouse MSCs does not lead to the restoration of cell cycle parameters, but provides a decrease the number of apoptotic cells in 24 h after exposure.

Keywords: exosomes, neural stem cells, mesenchymal stem cells, brain, neurons, astrocytes, gamma irradiation, apoptosis, cell cycle, mice

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 571.27

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ, СЕКРЕТИРУЕМЫЕ
АКТИВИРОВАННЫМИ КЛЕТКАМИ ТНР-1, ВЛИЯЮТ
НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ВОСПАЛЕНИЯ В ОРГАНАХ *Danio rerio*

© 2024 г. Д. Б. Самбур¹, О. В. Калинина¹, А. Д. Акино¹, П. В. Тирикова¹, М. А. Мигунова¹,
Е. Е. Королева¹, А. С. Трулев², А. А. Рубинштейн^{1,2}, И. В. Кудрявцев^{1,2}, А. С. Головкин¹ *

¹ФГБУ НМИЦ им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург, Россия

²ФГБУ “Институт экспериментальной медицины”, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: golovkin_a@mail.ru

Поступила в редакцию 17.06.2023 г.

После доработки 04.09.2023 г.

Принята к публикации 05.09.2023 г.

Внеклеточные везикулы, секретируемые иммунокомпетентными клетками, могут играть значительную роль в инициации, поддержании и прогрессировании системного воспаления. Цель исследования – изучить регуляторное влияние внеклеточных везикул, продуцированных активированными моноцитоподобными клетками линии ТНР-1, на уровень экспрессии генов воспаления в органах рыб *Danio rerio*. После интрацеломической инъекции ВВ, продуцированных клетками ТНР-1, активированных фактором некроза опухолей α (TNF α) и форбол-миристан-ацетатом (РМА) в разных концентрациях, оценивали относительный уровень экспрессии генов *il-1 β* , *il-6*, *tnf- α* , *ifn- γ* , *mpeg1.1*, *mpeg1.2*, *trpx*, *il-10* в мозге, печени и сердце методом ПЦР в реальном времени. Введение ВВ, секретируемых клетками ТНР-1, активированными TNF в концентрации 10 нг/мл и РМА в концентрациях 16 и 50 нг/мл, снижали экспрессию генов *il-1 β* , *ifn- γ* , *tnf- α* , *trpx*, *mpeg1.1*, *mpeg1.2* и *il-10* в мозге, сердце и печени рыб *Danio rerio*. При этом ВВ, секретируемые клетками ТНР-1 под воздействием TNF в дозах 10 и 20 нг/мл, обладали разнонаправленными эффектами на экспрессию гена *il-1 β* в мозге; на гены *il-1 β* , *il-10* и *il-6* в сердце и на гены *il-1 β* , *il-6*, *il-10* в печени. ВВ, секретируемые клетками ТНР-1 под воздействием РМА в дозах 16 и 50 нг/мл, обладали аналогичными разнонаправленными эффектами в отношении генов *il-6* и *il-10* в сердце и на ген *ifn- γ* в печени. ВВ, продуцируемые активированными клетками ТНР-1, при интрацеломическом введении рыбам *Danio rerio* оказывают системный эффект, проявляющийся изменением экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов в головном мозге, печени и сердце. В зависимости от вида и дозы использованного для активации стимула может меняться качественный состав продуцируемых везикул, что проявляется в силе и направленности детектируемых *in vivo* эффектов.

Ключевые слова: внеклеточные везикулы, клетки ТНР-1, *Danio rerio*, зебрафиш, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S1027813324010096, **EDN:** GYTGWD

ВВЕДЕНИЕ

Системное воспаление представляет собой сложную реакцию организма в ответ на серьезные повреждающие факторы, такие как обширные травмы, инфекции, хирургические вмешательства, ишемические и реперфузионные повреждения и др. Несмотря на то что развитие системной воспалительной реакции направлено на защиту организма, формирующийся нерегулируемый цитокиновый шторм способен вызвать массивный воспалительный каскад, приводящий к нарушению функций многих органов или даже к смерти [1–3]. Выраженность эффектов цитокинов, а также

их направленность (протективная или повреждающая) связана, в первую очередь, со степенью дисбаланса про- и противовоспалительных факторов. При этом важнейшими оказываются дистантные эффекты цитокинов. Так, фактор некроза опухолей α (TNF α), интерлейкин-1 (IL-1), IL-6, воздействуя на центр терморегуляции, вызывают повышение температуры тела с лихорадкой, стимулируют продукцию лейкоцитов в костном мозге, усиливают продукцию белков острой фазы (С-реактивный белок и др.) клетками печени и т.д. [4]. Вместе с тем возможны и негативные эффекты цитокинов: высокий уровень TNF приводит к снижению

сердечного выброса, повышению проницаемости сосудов, усилению тромбообразования, метаболическим нарушениям, связанным с изменением резистентности к инсулину, и т.д. [4–6]. Таким образом, дисбаланс цитокинов является одним из наиболее важных патогенетических звеньев развития системного воспалительного ответа (СВО). Гиперпродукция провоспалительных цитокинов оказывается важнейшей составляющей фазы первичного флогогенного удара СВО [7]. Считается, что в этих процессах ключевую роль играет врожденная иммунная система и активность ее клеток (моноцитов, макрофагов, нейтрофилов и т.д.) [5]. Вместе с тем продуцентами провоспалительных цитокинов могут выступать клетки других органов и тканей (эндотелиоциты, кардиомиоциты, гепатоциты и т.д.). При этом, вне зависимости от того, в каком органе было инициировано воспаление, происходит вовлечение отдаленных органов, что получило название компартиментализации воспаления [8].

Таким образом, вопросы, связанные с регуляцией цитокинового шторма и компартиментализации воспаления, оказываются очень важными в изучении патогенеза СВО. Поскольку на начальных этапах формирования системного воспаления ведущая роль отводится клеткам врожденной иммунной системы и, в первую очередь, клеткам моноцитарно-макрофагального ряда, то традиционно используемой моделью является культура клеток ТНР-1 (human leukemia monocytic cell line – моноцитоподобная клеточная линия), полученная от пациента с острым моноцитарным лейкозом [9]. В литературе описаны разные варианты активации ТНР-1 клеток, например, форбол-миристан-ацетат (phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), фактор некроза опухолей, перекись водорода, инфицирование микроорганизмами и др. [10, 11], при этом для дальнейшей поляризации в направлении М1 (классически активированных) макрофагов используют интерферон γ (IFN γ) и липополисахарид (ЛПС), а для поляризации в М2 (альтернативно активированные) макрофаги – интерлейкин-4 (IL-4) и интерлейкин-13 (IL-13) [12, 13].

В настоящее время большое внимание уделяется внеклеточным везикулам как инструменту регуляции активности клеток, межклеточных взаимодействий, а также компартиментализации воспаления [14–16]. В зависимости от своего происхождения внеклеточные везикулы могут нести различные клеточные компоненты, включая мРНК, микроРНК, длинные некодирующие РНК, ДНК, метаболиты, белки и липиды [17, 18], и влиять на активность как соседних, так и отдаленных клеток, потенциально вызывая системные эффекты [18].

Традиционно, говоря о внеклеточных везикулах, по размеру объектов и механизмам их формирования выделяют три группы: экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца. Последние имеют

размеры от 50 до 5000 нм (чаще баланс смещен в сторону более крупных объектов) и образуются в результате программируемой клеточной гибели. Экзосомы от 30 до 150 нм в диаметре образуются путем внутреннего отпочкования от пограничной мембраны ранних эндосом, которые во время этого процесса созревают в мультивезикулярные тельца. Поскольку экзосомы образуются внутри клетки, вне зависимости от их клеточного происхождения, они оказываются насыщенными вспомогательными белками – Alix, TSG101, HSC70, HSP90 β [19]. Собственно внеклеточные везикулы (микровезикулы) имеют размеры 100–1000 нм в диаметре и образуются путем отпочкования от плазматической мембраны клетки. В результате они содержат белки, ассоциированные с цитозолем и плазматической мембраной (например, тетраспанины) [20]. Уникальность микровезикул заключается в том, что они обладают способностью упаковывать активный груз (белки, нуклеиновые кислоты и липиды) и доставлять его в другую клетку, соседнюю или отдаленную, а также изменять функции клетки-реципиента при его доставке [19, 20].

В настоящее время все больше исследований, моделирующих патологические состояния, проводят на маленьких тропических пресноводных рыбах *Danio rerio*. Они имеют более 70% общих генов-ортологов с *Homo sapiens*, в частности, гены, участвующие в органоспецифических генетических программах регуляции пролиферации, воспаления и т.д. [21]. Это предопределяет возможность использования рыб для изучения различных патологических процессов и заболеваний человека [22, 23].

Таким образом, исследование механизмов регуляции воспаления является важным для понимания патогенеза системного воспалительного ответа, а рыбы *Danio rerio* представляются удобной моделью для изучения участия внеклеточных везикул в регуляции и компартиментализации СВО. Цель работы: изучить регуляторное влияние внеклеточных везикул, продуцированных активированными моноцитоподобными клетками линии ТНР-1, на уровень экспрессии генов воспаления в органах рыб *Danio rerio*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования представлен на рис. 1. На первом этапе для получения различных популяций внеклеточных везикул осуществляли активацию моноцитоподобных клеток линии ТНР-1 посредством воздействия различных стимулов. После чего проводили фенотипическую характеристику внеклеточных везикул, секретлируемых клетками ТНР-1. Полученные внеклеточные везикулы вводили в целомическую полость рыбам *Danio rerio* и по истечении суток проводили биобанкирование жизненно важных органов (печень, сердце и мозг).

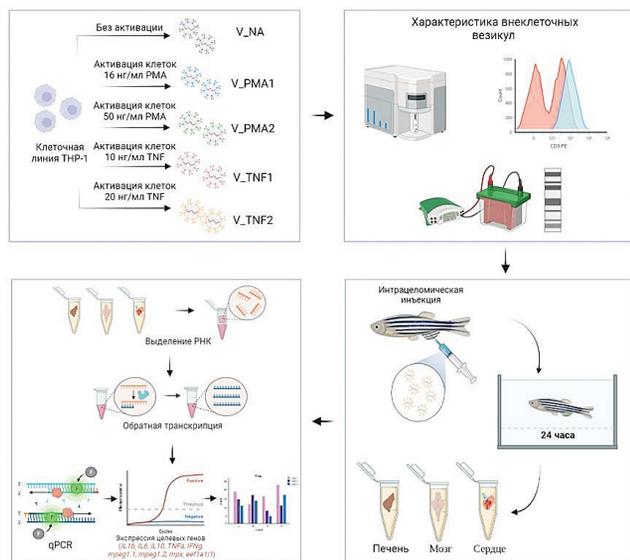


Рис. 1. Дизайн исследования.

На следующем этапе оценивали уровень органной экспрессии генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов.

Получение и характеристика внеклеточных везикул

В работе использовали культуру опухолевых моноцитоподобных клеток линии THP-1 («Российская коллекция клеточных культур института цитологии РАН», Россия), которую культивировали в питательной среде RPMI-1640 («Биолот», Россия) с добавлением L-глутамина («Биолот», Россия), 50 мкг/мл сульфата гентамицина и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Nucleon, США) по стандартной методике в CO₂-инкубаторе (при 37°C и 5% CO₂) со сменой культуральной среды каждые 3 дня согласно протоколу, описанному ранее [24, 25].

Для получения популяций внеклеточных везикул 200 мкл суспензии клеток в концентрации 1×10^5 переносили в лунки 96-луночного планшета (Sarstedt, Германия) и активировали посредством воздействия стимулами: фактором некроза опухоли (TNF) (Biolegend, Калифорния, США) в конечной концентрации 10 и 20 нг/мл или форбол-12-мири-стат-13-ацетатом (PMA) (Sigma Aldrich, Миссури, США) в конечной концентрации 16 и 50 нг/мл. В качестве контроля в среду вносили раствор DPBS (р-р Дульбекко без Ca и Mg, «Биолот», Россия). THP-1 клетки культивировали в течение 24 ч в стандартных условиях [24, 25]. Внеклеточные везикулы получали методом последовательного центрифугирования, для чего суспензию клеток осаждали в течение 20 мин при 330g, далее надосадочную жидкость двукратно центрифугировали

в течение 20 мин при 1500g и однократно — при 3000, каждый раз удаляя осадок. Надосадок пропускали через фильтр Millex с диаметром пор 800 нм (Merck-Millipore, Массачусетс, США). Далее концентрирование внеклеточных везикул производили посредством центрифугирования надосадка 30 мин при 16000g. В результате надосадок удаляли, а осадок ресуспендировали в 100 мкл DPBS без Ca и Mg («Биолот», Россия).

Иммунофенотипирование ВВ проводили с использованием следующих моноклональных антител, конъюгированных с флуорофорами: anti-CD54-PE (Beckman Coulter, Калифорния, США), Annexin V-FITC (Biolegend, Калифорния, США), anti-CD14-KromeOrange (Beckman Coulter, Калифорния, США), anti-CD9-PE/Cy7 (Beckman Coulter, Калифорния, США), anti-CD63-APC (Beckman Coulter, Калифорния, США) согласно протоколу, опубликованному ранее [26–28]. Анализ осуществляли на проточном лазерном цитометре CytoFLEX S (Beckman Coulter, Калифорния, США), оснащенном фиолетовым (405 нм), голубым (488 нм), красным (638 нм) и желто-зеленым (561 нм) лазерами, с помощью программной среды Cytexpert 2.4 (Beckman Coulter, Калифорния, США) и Kaluza 2.1 (Beckman Coulter, Калифорния, США). Калибровку и настройку прибора проводили с использованием стандартных калибровочных частиц известного размера от 100 до 1000 нм (Cytometry Sub-Micron Particle Size Reference Kit, Molecular probes, Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Массачусетс, США). Начальный сигнал регистрировали по каналу бокового светорассеяния с фиолетового лазера, по которому применяли дискриминатор. Исследование объектов проводили по соответствующим каналам флуоресценции. Гейты строили на основании контрольных образцов, включающих только моноклональные антитела, внесенные в PBS. Для анализа логически формировали единую популяцию объектов, позитивных хотя бы по одному из использованных маркеров. Данные с проточного цитометра представляли в виде количества положительных событий в микролитре, а также удельного веса позитивных событий по таргетному маркеру, выраженному в процентах. Все контроли, в том числе контроль наличия мембран с использованием детергентов, контроль ложноположительных и ложноотрицательных результатов, были выполнены в соответствии с требованиями MISEV2018 [29–31]. Для исключения эффекта наложения использовали разведения образцов 1:100. Показатель получали в результате проведенных исследований серий последовательных разведений.

Исследование размеров внеклеточных везикул и их дисперсности оценивали с использованием метода динамического рассеяния света на приборе Nanolink SZ902M (Linkoptik, Китай). Исследование

проводили при следующих параметрах: температура – 25°C, рефрактерный индекс растворителя – 1.330, позиция измерения – 4.65 мм, аттенуатор – 0. Исследование проводили в трех повторях по 100 с в каждом. Для анализа полученных результатов использовали программное обеспечение Linkoptik Ver. 2.0.0.7. Образцы внеклеточных везикул оценивали по параметрам размеров объектов (peak size, nm), средняя Z (average Z, nm), индекс полидисперсности (polydispersity index – PdI), стандартное отклонение (St. deviation, nm).

Определение белкового состава исследуемых ВВ осуществляли методом вестерн-блот. Разделение белков проводили методом SDS-PAGE гель-электрофореза. Образцы предварительно прогревали 5 мин при 95°C в буфере Laemmli sample buffer (Bio-Rad, Калифорния, США), содержащим 2-меркаптоэтанол (Bio-Rad, Калифорния, США). В качестве стандарта молекулярных масс использовали PageRuler™ (ThermoFisher Scientific, Массачусетс, США). В качестве положительного белкового контроля использовали лизат клеток ТНР-1 (ТНР-1 total). После прохождения электрофореза разделенные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, Калифорния, США) в течение 1 ч при постоянном напряжении 100 В. Для контроля переноса белков мембрану окрашивали Ponceau S (ThermoFisher Scientific, Массачусетс, США). После переноса мембрану промывали Tris Buffered Saline with Tween® 20 (TBST) буфером и блокировали в 5%-ном растворе молока в 1x TBST буфере в течение 90 мин при комнатной температуре. После чего мембрану инкубировали с первичными антителами HSP70 (D69) Antibody 4876 (1:1000), CD9 (D8O1A) Rabbit mAb 13174 (1:1000) (Cell Signaling Technology, Массачусетс, США) в течение ночи при 4°C, далее после отмывки в TBST буфере с вторичными антителами Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody 7074 (1:2000) (Cell Signaling Technology, Массачусетс, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Для визуализации использовали проявитель SuperSignal™ (ThermoFisher Scientific, Массачусетс, США). Снимки мембран осуществляли с помощью системы гель-документации Fusion FX Vilber Lourmat.

Исследование размера и концентрации ВВ проводили с использованием технологии анализа траектории наночастиц (Nanoparticle tracking analysis – NTA) с видеофиксацией в течение 60 с в режиме равномерной потоковой подачи на приборе NanoSight NS300 (Malvern Panalytical, UK). Для каждого образца выполняли 5 технических повторов. Полученные изображения оценивали визуально с использованием программного обеспечения NTA 3.4 NanoSight (Malvern Panalytical, UK). Анализ проводили в диапазонах размерности объектов 30–150 и 150–400 нм, результаты представляли в виде количества частиц в миллилитре.

Дизайн эксперимента in vivo

Протокол эксперимента был одобрен Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных НМИЦ им. В.А. Алмазова (выписка № 8 из протокола № 22-8/1 от 31 августа 2022 г.).

Исследование эффектов внеклеточных везикул проводили на рыбах *Danio rerio* обоего пола в возрасте 4–5 месяцев. Животных содержали в стандартных условиях: светотемновой режим 14:10, кормление готовыми рационами Tetra mini granules 2 раза в сутки, температура воды 28.0°C с рН 6.8–7.4.

Всего было сформировано семь групп рыб: 1-я группа – контроль (рыбы интактные, без введения препарата); 2-я группа – DPBS (введение раствора DPBS); 3-я группа – V_NA (введение ВВ, секретированных неактивированными клетками ТНР-1); 4-я группа – V_PMA1 (введение ВВ, секретированных клетками ТНР-1 после активации PMA в концентрации 16 нг/мл); 5-я группа – V_PMA2 (введение ВВ, секретированных клетками ТНР-1 после активации PMA в концентрации 50 нг/мл); 6-я группа – V_TNF1 (введение ВВ, секретированных клетками ТНР-1 после активации TNF в концентрации 10 нг/мл); 7-я группа – V_TNF2 (введение ВВ, секретированных клетками ТНР-1 после активации TNF в концентрации 20 нг/мл). В каждую группу было включено не менее 10 рыб.

Во всех случаях интрацеломическую инъекцию образца в объеме 2 мкл осуществляли в состоянии медикаментозного сна, достигаемого путем помещения рыбы в анестезирующий раствор (пропофол 2.5 мг/л + лидокаин 50 мг/л). Использовали микроинъектор InjectMan 4 (Eppendorf, Великобритания) и одноразовые боросиликатные стеклянные капилляры с филаментной нитью (O.D. 1.5 mm, I.D. 0.86 mm) (Sutter instrument, Калифорния, США). После манипуляций каждую рыбу помещали в индивидуальный аквариум с добавлением метиленового синего. Спустя сутки рыб подвергали эвтаназии передозировкой пропофола (25 мг/л). Препаровку проводили стерильным микрохирургическим инструментом с использованием стереоскопического микроскопа (АО “ЛОМО”, Россия) и забирали внутренние органы (печень, мозг, сердце). Полученный материал помещали в отдельные стерильные пробирки, содержащие 800 мкл реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия), замораживали и хранили при –80°C до последующего использования.

Выделение тотальной РНК

Выделение тотальной РНК из тканей печени, мозга и сердца проводили с использованием реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия) согласно

инструкции производителя. Кратко, к замороженным образцам добавляли дополнительно 200 мкл ExtractRNA, гомогенизировали пипетированием, инкубировали 40 мин при комнатной температуре и центрифугировали 10 мин при 13 000 g при комнатной температуре. После центрифугирования 1 мл супернатанта отбирали в чистые пробирки и добавляли 200 мкл хлороформа с последующей инкубацией в течение 5 мин при комнатной температуре. Далее образцы центрифугировали 15 мин при 13 000 g при 4°C. К верхней фазе добавляли 1 мкл голубого гликогена и 500 мкл изопропанола, перемешивали и оставляли при –20°C на ночь. Далее центрифугировали 15 мин при 13 000 g при 4°C, осадок промывали дважды 75%-ным этиловым спиртом (центрифугировали 5 мин при 20 000 g при 4°C). Осадок сушили на льду до полного испарения спирта и элюировали в 15 мкл свободной от нуклеаз воде. Качество и количество выделенной тотальной РНК оценивали с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 UV Visible Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific, Массачусетс, США).

Обратная транскрипция

Обратную транскрипцию осуществляли с использованием 500 нг выделенной тотальной РНК, 20 мкМ случайного праймера (“Евроген”, Россия) и фермента MMLV RT kit (“Евроген”, Россия) при 37°C в течение 60 мин согласно протоколу производителя. Синтезированную кДНК хранили при –80°C.

Оценка уровня экспрессии генов

Относительный уровень экспрессии генов *il-1β*, *il-6*, *tnf-α*, *ifn-γ*, *mpeg1.1*, *mpeg1.2*, *mpx* и *il-10* в клетках органов рыб *Danio rerio* определяли методом ПЦР в реальном времени, как описано ранее [32]. Последовательности праймеров исследованных генов представлены в дополнительных материалах, таблица S1. ПЦР в реальном времени проводили с использованием набора реагентов qPCRMix-HS SYBR+LowROX (“Евроген”, Россия) согласно протоколу производителя. ПЦР осуществляли на приборе LightCycler 480 (“Roche”, Швейцария) при следующих условиях: 45 циклов 95°C в течение 15 с, 60°C в течение 30 с, 70°C в течение 30 с. Для анализа ПЦР использовали программное обеспечение к амплификатору LightCycler®480 Software version 1.5.1.62 SP3 (Roche, Швейцария). Детекция накопления флуоресцентного сигнала проводилась на стадии элонгации в каждом цикле амплификации. Пороговый цикл (Ct) для каждого образца определяли на основании цикла, при котором кривая флуоресценции пересекала пороговую линию. Пороговая линия, представляющая собой фоновый уровень флуоресценции,

рассчитывалась программным обеспечением. В качестве референсного гена для нормализации данных использовали ген домашнего хозяйства *eef1a1* [32]. Для относительной количественной оценки экспрессии генов использовали метод $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Выбросы значений $2^{-\Delta\Delta Ct}$ определяли с помощью метода ROUT (Q = 5%) и исключали из дальнейшего анализа.

Статистический анализ

Статистическую обработку результатов выполняли с использованием программы GraphPad Prism 8.00 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Me (25; 75)). Различия между группами рассчитывали с помощью непараметрического U-критерия Манна – Уитни. Корреляционные связи между изучаемыми показателями определяли с помощью критерия Спирмена. Различия считали достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Характеристика образцов внеклеточных везикул

Все образцы ВВ продемонстрировали умеренную полидисперсность при исследовании методом динамического рассеяния света (рис. 2, а, б). Образцы ВВ, продуцируемые клетками ТНР-1 при стимуляции TNF, имели наибольшие размеры, тогда как образцы ВВ, полученные в результате стимуляции клеток РМА, имели наибольший диапазон размерности (примерно до 110 нм и пиком, приходящимся на 36 нм).

При исследовании концентраций ВВ методом NTA достоверных отличий между образцами выявлено не было (рис. 3). При анализе везикул в разных диапазонах размерностей были выявлены следующие закономерности. Достоверных различий в размерах внеклеточных везикул, а также в концентрациях частиц в диапазоне 150–400 нм при использовании разных стимулов не наблюдалось как в сравнении с контролем, так и между собой. Достоверные различия были выявлены при сравнении частиц в диапазоне размеров 30–150 нм. Так, было отмечено увеличение концентрации внеклеточных везикул, продуцируемых клетками ТНР-1 при стимуляции TNF в дозах 10 и 20 нг/мл, а также РМА в дозах 16 и 50 нг/мл по сравнению с таковыми, продуцированными нестимулированными клетками ($p < 0.01$).

Качественный состав продуцированных под воздействием различных активаторов ВВ оценивали посредством фенотипирования методом высокочувствительной проточной лазерной цитометрии (рис. 4). Уровень Annexin V-позитивных ВВ был достоверно повышен во всех образцах,

полученных от активированных клеток по сравнению с таковыми от неактивированных. Количество CD54+ ВВ было достоверно повышено в образцах ВВ, полученных при активации ТНР-1 клеток обоими стимулами во всех дозировках. При этом в большей степени уровень CD54-позитивных событий был повышен в образцах, полученных посредством активации клеток TNF в дозах 10 и 20 нг/мл. Во всех образцах ВВ после активации клеток обоими стимулами был отмечен повышенный уровень CD9+ и CD63+ объектов по сравнению с образцами от неактивированных клеток.

Вестерн-блот анализ продемонстрировал, что во фракции внеклеточных везикул присутствовал везикулярный мембранный маркер CD9 и маркер внутреннего содержимого – белок теплового шока 70 (HSP70) (рис. 2, в).

Органная экспрессия генов

Мозг. В образцах мозга рыб *Danio rerio* оценивали изменения относительного уровня экспрессии восьми генов, кодирующих семь провоспалительных (*il-1β*, *il-6*, *tnf-α*, *ifn-γ*, *mpeg1.1*, *mpeg1.2*, *trp*) и один противовоспалительный (*il-10*) цитокин. Введение раствора DPBS в целомическую полость рыб (группа DPBS) в качестве контроля реакции на проведение манипуляции вызывало достоверное увеличение уровня экспрессии генов *il-1β* ($p = 0.04$), *tnf-α* ($p = 0.04$), *mpeg1.1* ($p = 0.01$) и *mpeg1.2* ($p = 0.04$) по сравнению с интактными рыбами (контрольная группа) (рис. 5, таблица S2).

Введение ВВ приводило к достоверному снижению уровня экспрессии гена *il-1β* (рис. 5, а) в группах V_NA ($p = 0.05$), V_PMA1 ($p < 0.01$), V_PMA2 ($p < 0.01$) и V_TNF1 ($p < 0.01$); к снижению экспрессии гена *ifn-γ* в группах V_NA ($p = 0.04$), V_PMA2 ($p = 0.04$) и V_TNF1 ($p = 0.02$) (рис. 5, д); к снижению экспрессии гена *mpeg1.1* в группах V_NA ($p = 0.04$), V_PMA2 ($p < 0.01$) и V_TNF1 ($p = 0.01$) (рис. 5, ж); гена *tnf-α* в группах V_PMA1 ($p = 0.04$) и V_TNF1 ($p = 0.02$) (рис. 5, з) и гена *mpeg1.2* в группах V_NA ($p = 0.01$) и V_PMA1 ($p < 0.01$) (рис. 5, з) по сравнению с таковыми в группе DPBS.

ВВ, секретируемые ТНР-1 клетками под воздействием TNF в дозах 10 нг/мл (группа V_TNF1) и 20 нг/мл (группа V_TNF2), обладали разнонаправленными эффектами на экспрессию гена *IL-1β* (рис. 5, а) по отношению к таковому в группе DPBS. Под воздействием ВВ в группе V_TNF1 отмечалось снижение уровня экспрессии гена, в то время как в группе V_TNF2 – повышение.

ВВ, полученные при активации клеток одинаковым стимулом, но в разных дозах, демонстрировали достоверные отличия в уровне экспрессии генов в мозге. Так, у рыб в группе V_TNF2 был повышен уровень экспрессии генов *il-1β* ($p = 0.04$), *il-10*

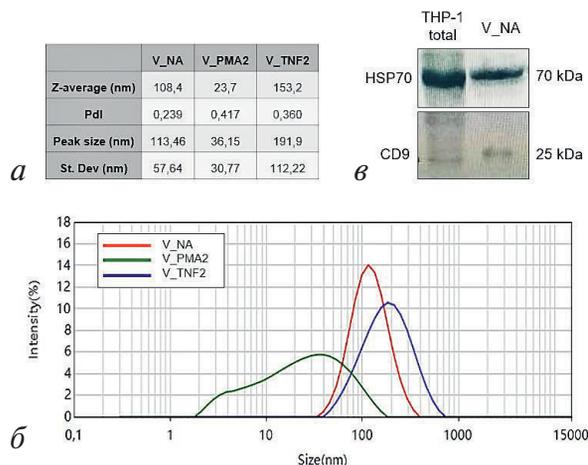


Рис. 2. Характеристика внеклеточных везикул, секретируемых клетками ТНР-1. Размер внеклеточных везикул (а) и дисперсность (б), оцененные по результатам использования метода динамического рассеяния света. Результаты вестерн-блот анализа (в), выполненного с антителами к белку теплового шока 70 (HSP70) и мембранному гликопротеину семейства тетраспанинов CD9. Обозначения: V_NA – ВВ, секретируемые неактивированными клетками ТНР-1; V_PMA2 – ВВ, секретируемые клетками ТНР-1 при стимуляции PMA в концентрации 50 нг/мл; V_TNF2 – ВВ, секретируемые клетками ТНР-1 при стимуляции TNF в концентрации 20 нг/мл; THP-1 total – лизат клеток.

($p = 0.02$) и *ifn-γ* ($p = 0.02$) по сравнению с таковым в группе V_TNF1, а в группе V_PMA2 – уровень экспрессии гена *mpeg 2.2* ($p = 0.02$) по сравнению с группой V_PMA1 (см. рис. 5).

Корреляционный анализ выявил положительные связи между уровнями экспрессии генов в группе контроля (рис. 6, а); в группе V_NA (рис. 6, в); в группах V_PMA1 (рис. 6, з), V_TNF1 (рис. 6, д) и V_TNF2 (рис. 6, е). Отрицательная корреляция наблюдалась только в группе V_PMA1 между уровнями экспрессии генов *il-1β* и *mpeg1.2*.

Сердце. В ткани сердца рыб *Danio rerio* оценивали изменения относительного уровня экспрессии шести генов, кодирующих пять провоспалительных (*il-1β*, *il-6*, *tnf-α*, *ifn-γ*, *mpeg1.1*) и один противовоспалительный (*il-10*) цитокин (рис. 7, таблица S3).

Под воздействием манипуляции в группе DPBS отмечали увеличение экспрессии генов *il-1β* ($p < 0.01$) (рис. 7, а), *il-6* ($p = 0.02$) (рис. 7, б), *il-10* ($p < 0.01$) (рис. 7, в) и *tnf-α* ($p = 0.02$) по сравнению с контрольной группой интактных рыб (рис. 7, з).

Введение ВВ приводило к достоверному снижению уровня экспрессии генов *il-10* (см. рис. 7, в) в группе V_PMA2 ($p < 0.01$) и увеличению в группе

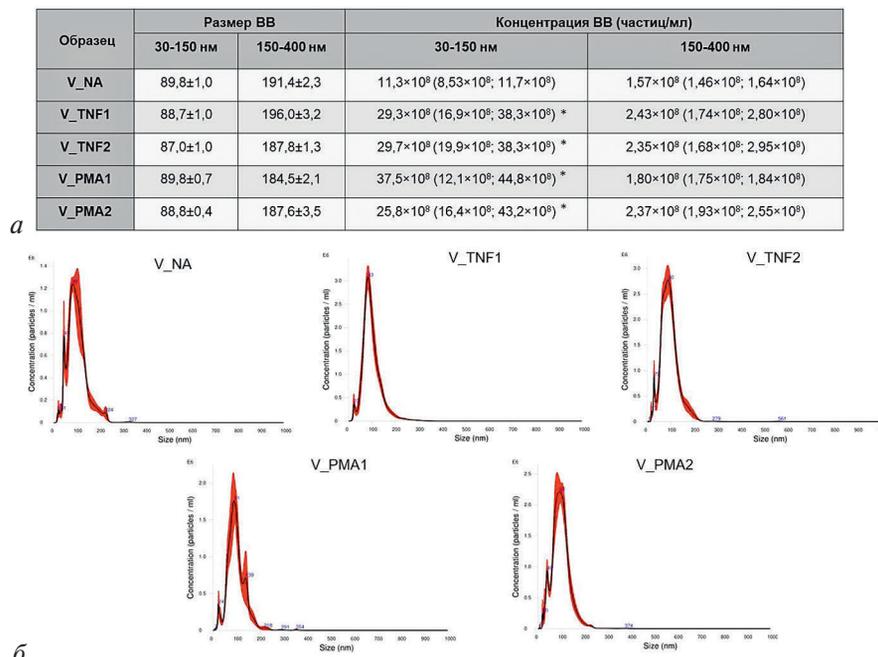


Рис. 3. Средние размеры и концентрация ВВ, секретируемых клетками ТНР-1, рассчитанные по результатам анализа траектории наночастиц в диапазонах 30–150 и 150–400 нм: *a* – таблица размер/концентрация продуцируемых внеклеточных везикул в диапазоне 30–150 и 150–400 нм; *b* – графики размер/концентрация ВВ, секретируемых ТНР-1 клетками при активации TNF и PMA в разных концентрациях. Обозначения: V_NA – ВВ, секретируемые неактивированными клетками ТНР-1; V_PMA1 – ВВ, секретируемые клетками ТНР-1 при стимуляции PMA в концентрации 16 нг/мл; V_PMA2 – ВВ, секретируемые клетками ТНР-1 при стимуляции PMA в концентрации 50 нг/мл; V_TNF1 – ВВ, секретируемые клетками ТНР-1 при стимуляции TNF в концентрации 10 нг/мл; V_TNF2 – ВВ, секретируемые клетками ТНР-1 при стимуляции TNF в концентрации 20 нг/мл.
* $p < 0.05$ – достоверность отличий с группой V_NA.

V_TNF2 ($p = 0.02$); к снижению экспрессии гена *tnf-α* (см. рис. 7, *з*) в группах V_PMA1 ($p = 0.03$) и V_TNF1 ($p = 0.01$) и к снижению экспрессии гена *mpeg1.1* (рис. 7, *е*) в группе V_TNF1 ($p = 0.04$) по сравнению с группой DPBS.

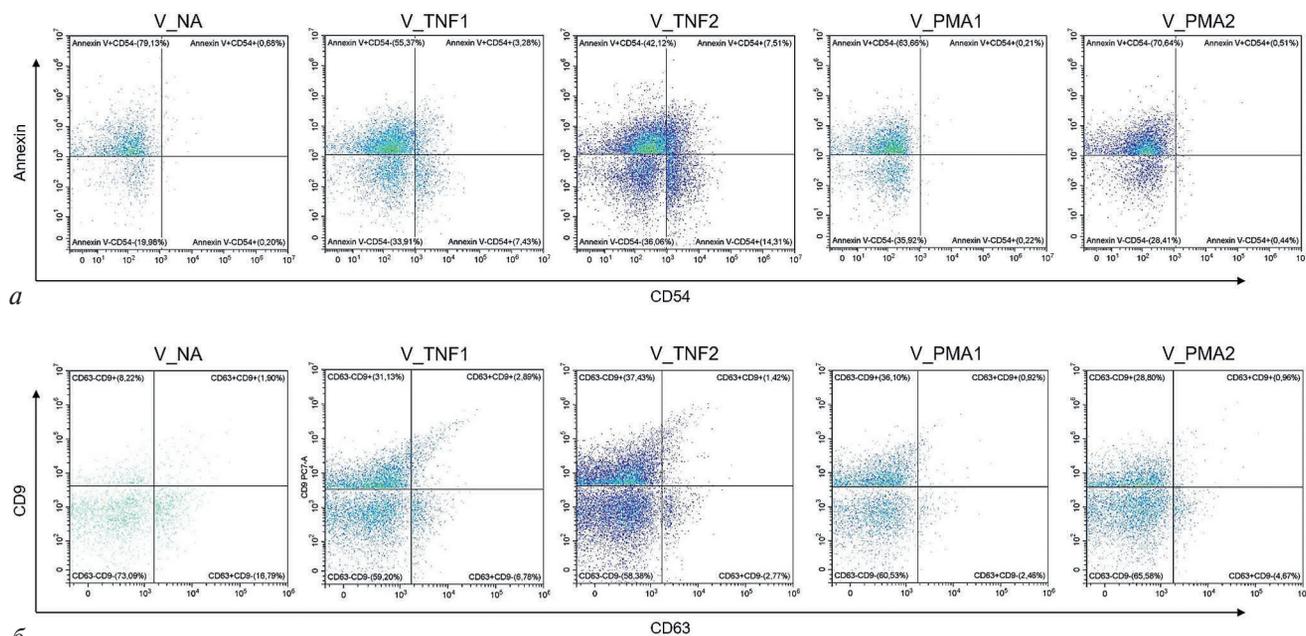
Инъекции ВВ в группах V_TNF1 и V_TNF2 оказывали разнонаправленные эффекты относительно группы DPBS на экспрессию генов *il-1β*, *il-6*, *il-10*. Везикулы группы V_TNF1 приводили к снижению уровня экспрессии, в то время как везикулы V_TNF2 – к повышению. Аналогичную закономерность можно отметить у ВВ из групп V_PMA1 и V_PMA2 в отношении экспрессии генов *il-6* и *il-10* (см. рис. 7).

Вводимые ВВ, полученные от одинаковых стимулов, но в разных дозах демонстрировали достоверные отличия в эффектах на уровень экспрессии генов в сердце. В группе V_TNF2 был повышен уровень экспрессии генов *il-1β* ($p < 0.01$), *il-6* ($p < 0.01$), *il-10* ($p < 0.01$), *tnf-α* ($p = 0.04$), *mpeg1.1* ($p = 0.03$) по сравнению с таковыми в группе V_TNF1; в группе V_PMA2 уровень экспрессии гена *il-10* был достоверно ниже, чем в группе V_PMA1 ($p < 0.01$).

Корреляционный анализ выявил положительную связь только в группе V_NA между уровнем экспрессии генов *il-1β* и *tnf-α*; отрицательная связь – в группе V_NA между *ifn-γ* и *il-6* и в группе DPBS между *ifn-γ* и *il-10* (рис. 8). В остальных группах V_PMA1, V_PMA2, V_TNF1 и V_TNF2 взаимосвязи между экспрессией генов цитокинов обнаружено не было.

Печень. В образцах печени рыб *Danio rerio* оценивали изменения относительного уровня экспрессии восьми генов, кодирующих семь провоспалительных (*il-1β*, *il-6*, *tnf-α*, *ifn-γ*, *mpeg1.1*, *mpeg1.2*, *txr*) и один противовоспалительный (*il-10*) цитокин (рис. 9, таблица S4).

При введении раствора DPBS в образцах печени в отличие от образцов мозга и сердца не наблюдали изменения уровня экспрессии ни одного из исследованных генов по сравнению с интактными рыбами. Инъекция ВВ, полученных от неактивированных клеток, в группе V_NA приводила к достоверному увеличению экспрессии генов *il-6* ($p = 0.03$) (рис. 9, *б*), *txr* ($p = 0.02$) (рис. 9, *е*) и *mpeg1.1* ($p = 0.03$) (рис. 9, *ж*) в сравнении с группой DPBS. В группе V_TNF2 отмечено достоверное



Группы	Внеклеточные везикулы (событий/мкл)				
	Annexin V+	CD9+	CD63+	CD54+	CD14+
V_NA	442 (122;966)	57,5 (31,7;96,0)	26,0 (20,5;44,0)	18,2 (5,5;20,0)	9,0 (8,0;9,0)
V_TNF1	2491 (309;3200)*	897,0 (445,7;2123,5)*	280,5 (172,5;445,5)*	329,2 (43,9;1177,0)*	12,5 (10,0;13,0)
V_TNF2	3378 (215;4242)*	872,0 (286,5;2746,0)*	240,0 (190,0;509,0)*	538,2 (27,5;1215,5)*	11,0 (8,0;15,7)
V_PMA1	1596 (132;2246)*	684,0 (358,0;1590,0)*	158,0 (58,0;560,50)*	44,5 (32,0;77,5)*	8,5 (5,0;16,5)
V_PMA2	2085 (315;2630)*	946,7 (647,5;2255,5)*	196,5 (92,0;640,0)*	37,0 (27,5;77,0)*	15,2 (13,5;17,0)

6

Рис. 4. Иммунофенотипирование внеклеточных везикул, секретируемых клетками ТНР-1, исследованные методом высокочувствительной проточной лазерной цитометрии. Репрезентативные двухпараметровые псевдоцветные графики результатов иммунофенотипирования – с anti-CD54-PE и Annexin V-FITC антителами (а); с anti-CD63-APC и anti-CD9-PE/Су7 антителами (б); в – концентрации позитивных по маркерам внеклеточных везикул. Результаты представлены в количестве событий в мкл, Ме (25; 75). Обозначения групп аналогичны рис. 3. * $p < 0.05$ – достоверность отличий с группой V_NA.

повышение экспрессии генов *il-1β* ($p = 0.02$), *il-6* ($p = 0.03$), *il-10* ($p = 0.02$) и *mpx* ($p = 0.03$); в группах V_PMA1 и V_PMA2 – снижение экспрессии гена *il-10* ($p = 0.01$ и $p = 0.03$ соответственно) по сравнению с таковыми в группе DPBS.

Разнонаправленными эффектами на экспрессию генов в печени обладали везикулы групп V_TNF1 и V_TNF2 в отношении *il-1*, *il-6*, *il-10*, а также везикулы групп V_PMA1 и V_PMA2 в отношении гена *ifn-γ*.

В группах V_TNF1 и V_TNF2 в ответ на введение ВВ в образцах печени наблюдали достоверно различающиеся эффекты на уровень экспрессии генов *il-1β* ($p < 0.01$), *il-10* ($p = 0.01$), *ifn-γ*, *mpx* ($p = 0.02$) и *mpeg1.2* ($p = 0.02$). Достоверно различающиеся эффекты были отмечены в группах V_PMA1 и V_PMA2 в отношении гена *ifn-γ* ($p = 0.04$).

Корреляционный анализ выявил положительную связь в группе DPBS между уровнем экспрессии генов *tnf-α* и *mpx*; в группе V_PMA2 – между *il-1β* и *mpeg1.2* (рис. 10); отрицательная корреляция была установлена в группе V_PMA1 между *tnf-α* и *mpeg1.2*, и в группе V_TNF2 – между *mpx* и *mpeg1.2*. В контрольной группе, а также в группах V_NA и V_TNF1 взаимосвязи между экспрессией генов про- и противовоспалительных цитокинов обнаружено не было.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проводимые с рыбой *Danio rerio* манипуляции (наркоз, временное извлечение из водной среды, пункция брюшной стенки, интрацеломическое введение DPBS) могут являться триггером

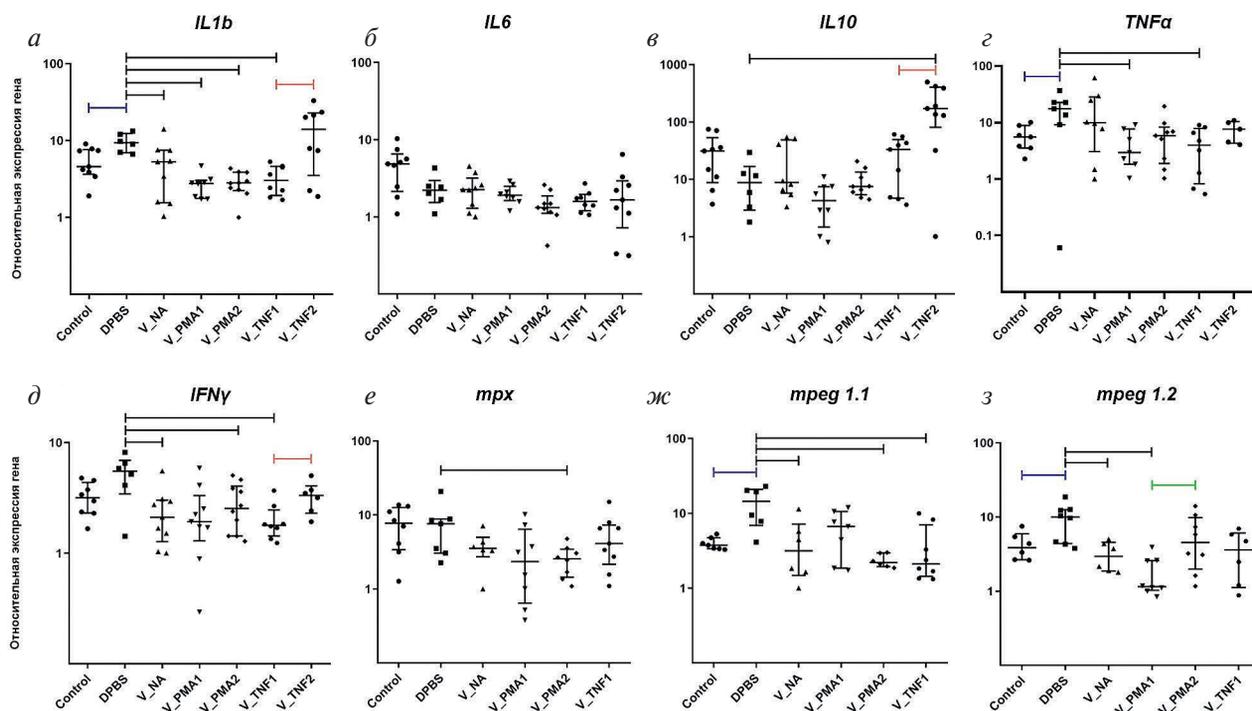


Рис. 5. Относительная экспрессия генов *il-1β* (а), *il-6* (б), *il-10* (в), *tnf-α* (г), *ifn-γ* (д), *mpx* (е), *mpeg 1.1* (ж), *mpeg 1.2* (з) в образцах мозга рыб *Danio rerio* исследуемых групп: Control – интактные рыбы; DPBS – инъекция раствора DPBS; V_NA – инъекция ВВ, секретируемых неактивированными клетками ТНР-1; V_PMA1 – инъекция ВВ, секретируемых клетками ТНР-1 при стимуляции РМА в концентрации 16 нг/мл; V_PMA2 – инъекция ВВ, секретируемых клетками ТНР-1 при стимуляции РМА в концентрации 50 нг/мл; V_TNF1 – инъекция ВВ, секретируемых клетками ТНР-1 при стимуляции TNF в концентрации 10 нг/мл; V_TNF2 – инъекция ВВ, секретируемых клетками ТНР-1 при стимуляции TNF в концентрации 20 нг/мл.

Синий цвет – достоверные отличия между группами Control и DPBS при $p < 0.05$.

Черный – достоверные отличия между группой DPBS и группами V_NA, V_PMA1, V_PMA2, V_TNF1, V_TNF2 при $p < 0.05$.

Зеленый цвет – достоверные отличия между группами V_PMA1 и V_PMA2 при $p < 0.05$.

Красный цвет – достоверные отличия между группами V_TNF1 и V_TNF2 при $p < 0.05$.

активации продукции провоспалительных цитокинов в отдаленных органах. Так, было показано увеличение экспрессии генов *il-1β* и *tnf-α* в мозге и сердце, *il-6* и *il-10* в сердце, а также *mpeg 1.1* и *mpeg 1.2* в мозге после интрацеломической инъекции DPBS по сравнению с интактными рыбами. Это демонстрирует ответ иммунной системы на проводимые манипуляции и соотносится с имеющимися представлениями о возможном развитии системного воспаления в ответ на значительные повреждения и вмешательство, а также с дальнейшим вовлечением отдаленных органов в поддерживающее воспаление [33–35].

Мы продемонстрировали возможность оказывать влияние на выраженность реакций на проводимые манипуляции на модели рыб *Danio rerio* посредством внеклеточных везикул, секретируемых активированными клетками ТНР-1. Было показано, что инъекция ВВ в целомическую полость рыб приводила к изменению профиля экспрессии

генов, кодирующих семь провоспалительных (*il-1β*, *il-6*, *tnf-α*, *ifn-γ*, *mpx*, *mpeg 1.1*, *mpeg 1.2*) и один противовоспалительный (*il-10*) цитокин, в отдаленных органах, таких как печень, сердце и мозг. Наблюдаемые изменения уровня экспрессии генов цитокинов после введения ВВ могут говорить об их системном воздействии на организм рыб *Danio rerio*.

Экзогенные внеклеточные везикулы могут присутствовать в кровотоке от нескольких минут до нескольких часов [36]. Их выведение из циркуляции, скорее всего, связано с задержкой и поглощением в органах-мишенях, причем скорость выведения и распределение по органам может в значительной степени зависеть от клеточного происхождения и состава везикул. Например, исследование биораспределения эритроцитарных ВВ показало поглощение печенью (44,9%), костями (22,5%), кожей (9,7%), мышцами (5,8%), селезенкой (3,4%), почками (2,7%) и легкими (1,8%) [37].

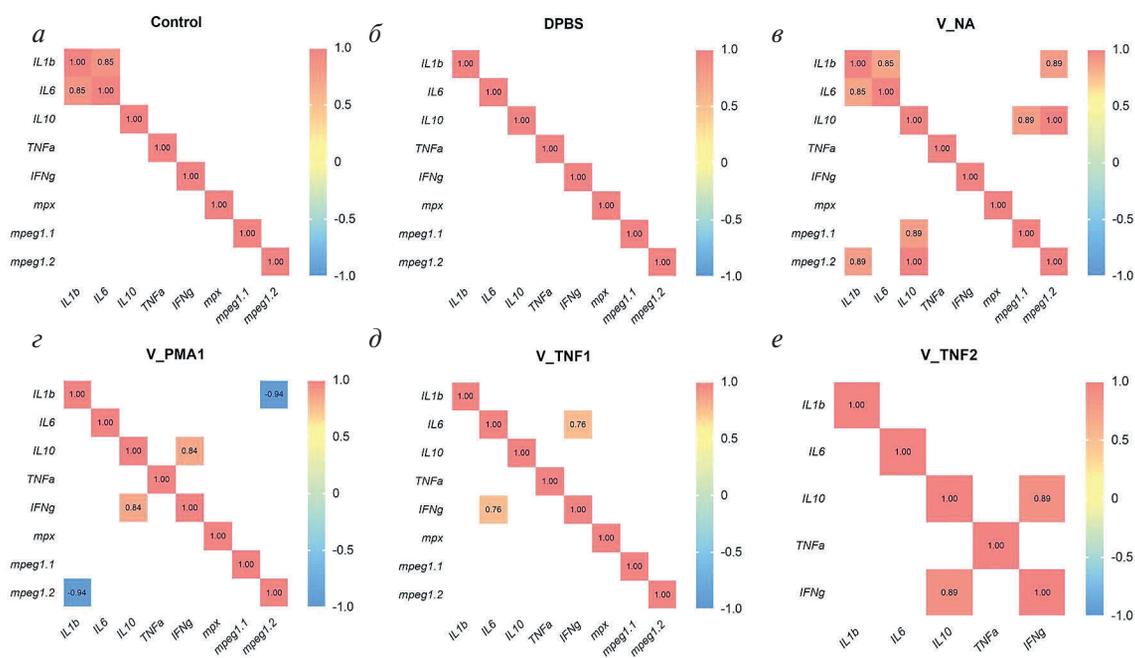


Рис. 6. Тепловая карта корреляции между относительной экспрессией генов в образцах мозга рыб *Danio rerio* внутри каждой исследуемой группы. Представлены группы рыб только с достоверными корреляциями ($p < 0.05$): *a* – группы рыб, обозначения которых аналогичны рис. 5. Полоса цветовой шкалы показывает диапазон коэффициента корреляции (r). Красный цвет обозначает высокую положительную корреляцию, уменьшающуюся до синей полосы, которая представляет отрицательную корреляцию.

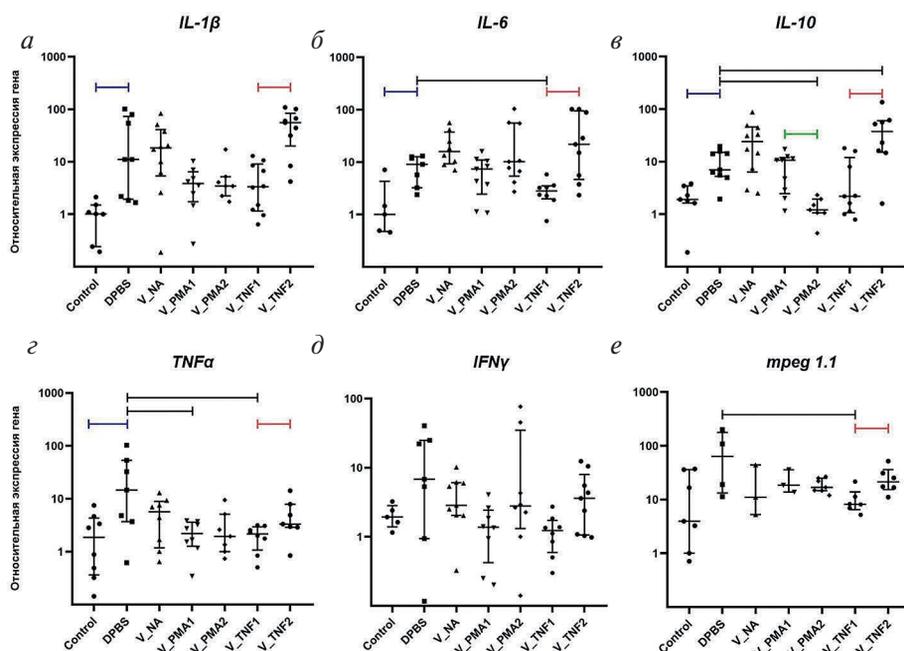


Рис. 7. Относительная экспрессия генов *il-1 β* (*a*), *il-6* (*б*), *il-10* (*в*), *tnf- α* (*г*), *ifn- γ* (*д*), *mpeg1.1* (*е*) в образцах сердца рыб *Danio rerio* исследуемых групп. Достоверные отличия между группами при $p < 0.05$. Обозначения групп рыб аналогичны рис. 5.

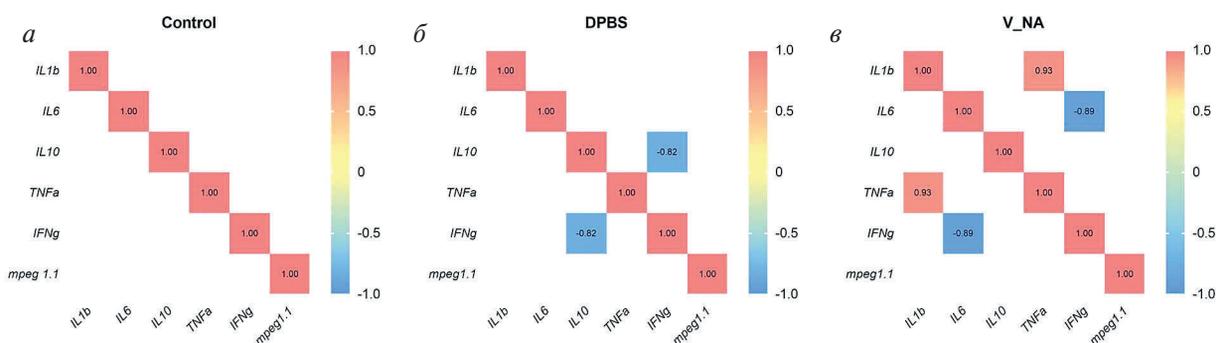


Рис. 8. Тепловая карта корреляции между экспрессией генов в образцах сердца рыб *Danio rerio*. Представлены группы рыб только с достоверными корреляциями ($p < 0.05$): $a - c$ – группы рыб, обозначения которых аналогичны рис. 5. Полоса цветовой шкалы показывает диапазон коэффициента корреляции (r). Красный цвет обозначает высокую положительную корреляцию, уменьшающуюся до синей полосы, которая представляет отрицательную корреляцию.

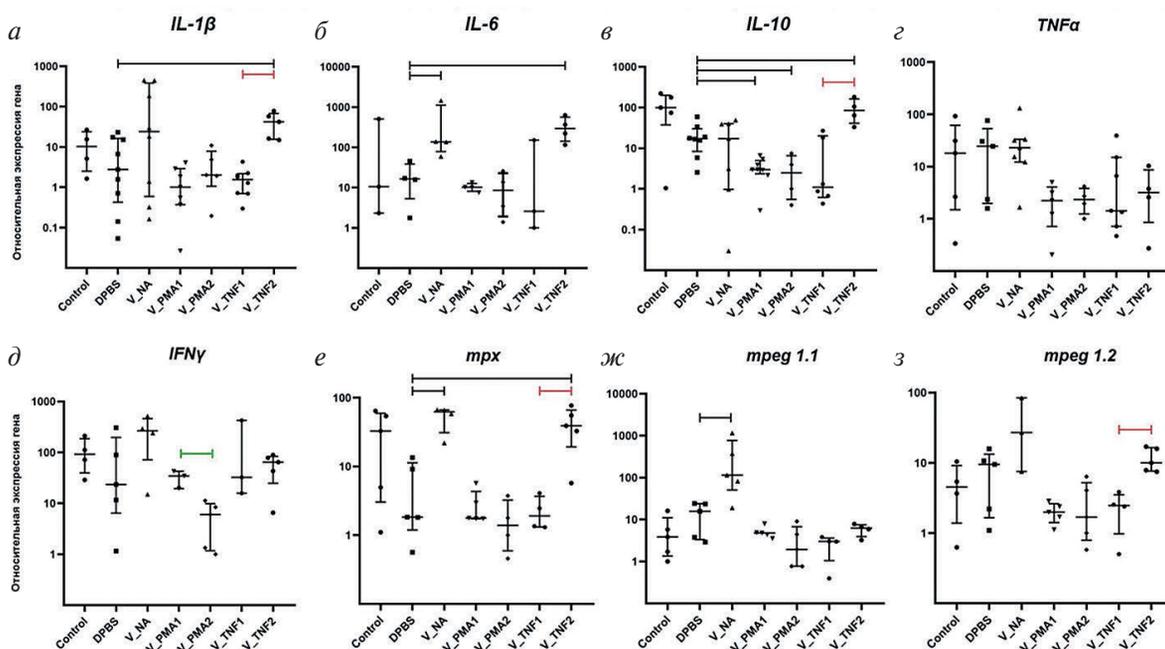


Рис. 9. Относительная экспрессия генов *il-1 β* (а), *il-6* (б), *il-10* (в), *tnf- α* (г), *ifn- γ* (д), *mpx* (е), *mpeg 1.1* (ж), *mpeg 1.2* (з) в образцах печени рыб *Danio rerio* исследуемых групп. Достоверные отличия между группами при $p < 0.05$. Обозначения групп рыб аналогичны рис. 5.

ВВ, полученные из клеток злокачественных опухолей простаты, почек, мочевого пузыря, при экспериментальном введении в кровотоку распределялись по органам по-разному, в зависимости от вида опухоли (рак простаты: легкие > печень > мозг; рак почки: мозг > легкие > печень; рак мочевого пузыря: легкие > печень > мозг). При этом поглощение экзосом другими органами, кроме легких, печени, головного мозга и селезенки, не было отмечено [38]. В нашем исследовании оценка эффектов

введенных везикул оценивалась через сутки после инфузии, что можно считать достаточным для их распределения по органам и реализации возможного эффекта.

Ранее *Golnaz Morad et al.* продемонстрировали распределение экзосом в организме рыб *Danio rerio* после их внутрисердечной инъекции [39]. С помощью кадровой визуализации авторы наблюдали процессы транцитоза объектов в нервную ткань, при этом целостность гематоэнцефалического

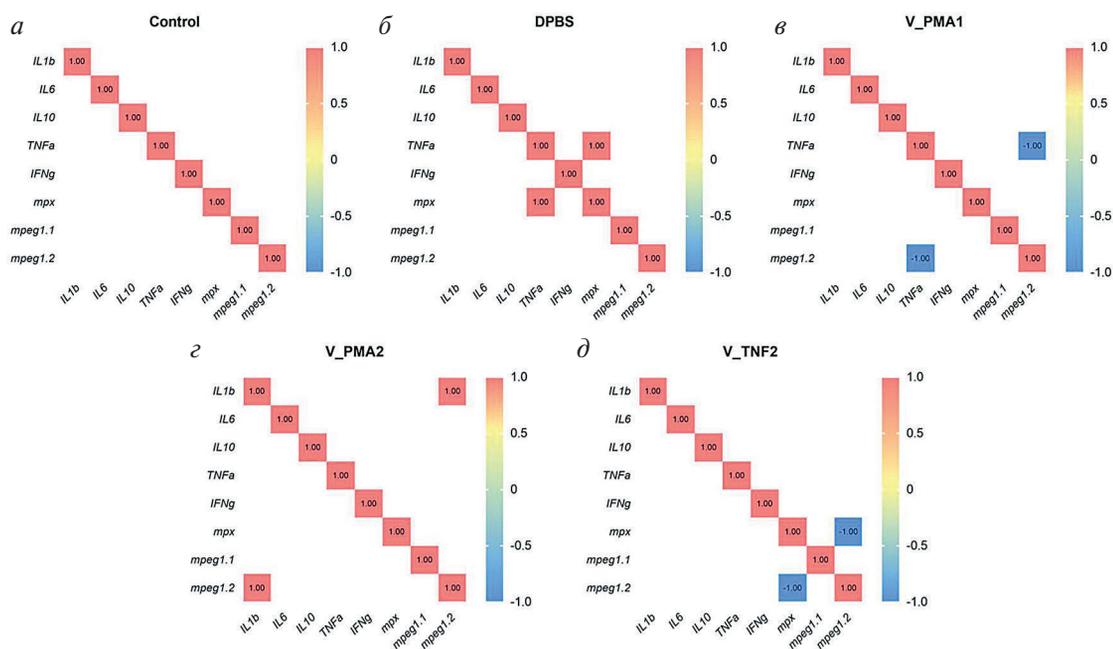


Рис. 10. Тепловая карта корреляции между экспрессией генов в образцах печени рыб *Danio rerio*. Представлены группы рыб только с достоверными корреляциями ($p < 0.05$); $a - d$ – группы рыб, обозначения которых аналогичны рис. 5. Полоса цветовой шкалы показывает диапазон коэффициента корреляции (r). Красный цвет обозначает высокую положительную корреляцию, уменьшающуюся до синей полосы, которая представляет отрицательную корреляцию.

барьера сохранялась, а его проницаемость для других компонентов крови не увеличивалась. В исследовании *in vivo* на мышинной модели *William A. Banks et al.* показали, что вводимые экзосомы способны проникать через гематоэнцефалический барьер [40]. В нашем исследовании была использована фракция микровезикул, обладающая определенной полидисперсностью с включением в свой состав объектов менее 100 нм в диаметре. При этом был отмечен эффект на уровень экспрессии генов цитокинов в клетках головного мозга, что в совокупности с литературными данными может указывать на проходимость исследуемых объектов через гематоэнцефалический барьер.

Модуляция нейровоспаления основана на способности микроглии и моноцитов/макрофагов взаимодействовать и проявлять два противоположных типа реагирования – по фенотипу М1 или фенотипу М2. Как результат, обеспечивается баланс цитотоксических и протективных эффектов в клетках центральной нервной системы [41]. Внеклеточные везикулы, являясь важным инструментом межклеточных взаимодействий и обладая возможностью преодолевать гематоэнцефалический барьер, могут обеспечивать рекрутирование макрофагов в мозг, усугубляя патологический статус [42]. Ранее было показано, что продуцируемые макрофагами ВВ, перенося провоспалительные цитокины, например

IL-1 β , к астроцитам и нейрональным клеткам, способны вызывать нейровоспаление [43]. Кроме того, продуцируемые макрофагами ВВ способны оказывать влияние на скорость проведения нейронального импульса. Причем эффект отличался у везикул, полученных от М0, М1 и М2 макрофагов [44].

Клетки как врожденного, так и адаптивного иммунитета способны продуцировать внеклеточные везикулы. При этом их функция будет в значительной мере связана с типом клеток [16]. В настоящем исследовании была использована линия моноцитоподобных клеток ТНР-1, традиционно считающейся релевантной моделью моноцитов/макрофагов. Известно, что внеклеточные везикулы последних обладают различными функциями. Так, они вызывают обусловленную воспалением программированную клеточную гибель гладкомышечных клеток посредством переноса функциональной пироптотической каспазы-1 [45]. Макрофагальные ВВ могут индуцировать дифференцировку наивных моноцитов в макрофаги [46]. Кроме того, эти везикулы содержат микроРНК miR-223, являющуюся важным регулятором пролиферации и дифференцировки миелоидных клеток, а также несут в своем составе молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС II) и костимуляторные молекулы, что позволяет им участвовать в презентации антигена [47].

В данном исследовании продемонстрировано, что внеклеточные везикулы, полученные от клеток ТНР-1, активированных РМА и TNF в разных дозах, обладали различными иммуномодулирующими свойствами в организме рыб *Danio rerio*. Инъекция ВВ, секретрируемых клетками ТНР-1 при воздействии TNF в концентрации 10 нг/мл и РМА в концентрациях 16 и 50 нг/мл, приводила к снижению экспрессии генов провоспалительных цитокинов (*il-1 β* , *ifn- γ* , *tnf- α* , *mpx*, *mpeg1.1* и *mpeg1.2*) в печени, сердце и мозге рыб *Danio rerio*. Подобные изменения свидетельствуют о потенциальных противовоспалительных эффектах, использованных ВВ.

Также было установлено, что активация клеток ТНР-1 воздействием TNF в концентрациях 10 и 20 нг/мл оказывала дозозависимый эффект на свойства секретрируемых этими клетками везикул. Так, внеклеточные везикулы, полученные от клеток ТНР-1, активированных обработкой 20 нг/мл TNF, приводили к большему увеличению экспрессии генов *il-10* и *il-1 β* в печени, сердце и мозге по сравнению с таковым от везикул, полученных от дозы TNF 10 нг/мл. Кроме того, достоверно отличался уровень экспрессии генов *il-6* в сердце и *mpx* в печени. В отношении эффектов от везикул, полученных при стимуляции клеток разными дозами РМА, были выявлены достоверные отличия между уровнями экспрессии генов *mpeg1.2* в мозге, *il-10* в сердце и *ifn- γ* в печени.

Интересно, что в ряде случаев были отмечены разнонаправленные эффекты ВВ, полученных при использовании разной дозы стимула TNF. В частности, ВВ в группе V_TNF1 вызывали снижение экспрессии *il-1 β* в мозге и сердце, в то время как V_TNF2 – повышение. Аналогичный эффект был в отношении *il-10* в сердце и печени, а *il-6* – в сердце. Полученные результаты свидетельствуют о том, что под воздействием различных видов стимулов, а также различных доз активаторов, моноцитоподобные клеточки продуцируют везикулы, качественно отличающиеся между собой, что приводит к разным эффектам при их инъекции в организм рыб *Danio rerio*. Эффекты ВВ связаны с составом переносимого ими груза, который может значительно различаться и включать нуклеиновые кислоты, липопротеиды, цитокины, ферменты и т.д. [16, 19, 36, 48]. При этом качественный состав ВВ разного клеточного происхождения зависит от клетки-продуцента [27, 36]. Мало того, Schindler V. с соавторами было показано, что эпителиальные клетки бронхов в одинаковых условиях продуцировали различные по размеру, уровню экспрессии тетраспанинов на поверхности, а также по переносимому набору микроРНК внеклеточные везикулы апикальной и базальной частями клеток [49]. Таким образом, характеристика продуцируемых везикул зависит не только от клеточного происхождения, влияния активаторов или блокаторов,

но и от пространственной организации и области самой клетки, где происходит синтез экзосом или микровезикул.

Везикулы, продуцированные клетками ТНР-1 после стимуляции всеми использованными активаторами, имели преимущественно меньшие размеры, чем таковые от нестимулированных клеток. Кроме того, полидисперсность объектов увеличилась в направлении неактивированные клетки – стимуляция TNF – стимуляция РМА. Размерность везикул является важным фактором, напрямую связанным с биогенезом объектов и, соответственно, с принадлежностью их к экзосомам или микровезикулам. При этом биологической активностью в отношении регуляции воспаления могут обладать обе категории внеклеточных везикул [16, 50]. Кроме того, несколько больший размер объектов, а также большее содержание аннексин V-позитивных объектов может быть признаком присутствия в образцах V_TNF2 апоптотических телец, которые также обладают высокой биологической активностью [51].

В образцах ВВ, полученных от стимулированных клеток (TNF и РМА), был более высокий уровень CD9+ и CD63+ объектов, т.е. несущих тетраспаниновые рецепторы, по сравнению с таковым от нестимулированных клеток. Кроме того, в образцах, полученных при стимуляции TNF, отмечалось повышенное содержание CD54-позитивных событий. Таким образом, морфология и качественный состав использованных в исследовании внеклеточных везикул различались в образцах в зависимости от использованных активаторов.

CD54 является индуцибельным белком клеточной адгезии, который играет ключевую роль во взаимодействии эндотелия и лейкоцитов и регулирует сосудистую проницаемость. Кроме этого, CD54 используют в качестве маркера активации антигенпрезентирующих клеток [52], а экспрессирующие его внеклеточные везикулы являются активными участниками регуляции воспаления [50]. Ранее было показано, что уровень CD54+ объектов коррелирует со степенью повреждения головного мозга при инсульте [53], а также повышается при субарахноидальном кровотечении [54, 55].

Таким образом, внеклеточные везикулы, секретрируемые клетками ТНР-1, обладают разным качественным составом в зависимости от способов активации клеток, способны оказывать влияние на экспрессию генов провоспалительных (*il-1 β* , *il-6*, *tnf- α* , *ifn- γ* , *mpeg1.1*, *mpeg1.2*, *mpx*) и противовоспалительных (*il-10*) цитокинов в тканях и органах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внеклеточные везикулы, продуцируемые моноцитоподобными клетками ТНР-1 под воздействием

различных стимулов, при интрацеллюлярном введении рыбам *Danio rerio* оказывают системный эффект, проявляющийся изменением экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов в головном мозге, печени и сердце. В зависимости от вида и дозы использованного для активации стимула может меняться качественный состав продуцируемых везикул, что проявляется в силе и направленности детектируемых *in vivo* эффектов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 19-75-20076. <https://rscf.ru/project/19-75-20076/>

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Протокол эксперимента был одобрен Комиссией по контролю содержания и использования лабораторных животных НМИЦ им. В.А. Алмазова (выписка № 8 из протокола № 22-8/1 от 31 августа 2022 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lenz A., Franklin G.A., Cheadle W.G. // Systemic inflammation after trauma / Injury. 2007. V. 38. № 12. P. 1336–1345.
2. Lee O., Xinyi Z., Partha D. // Pharmacological research. 2021. V. 170. P. 105692.
3. Головкин А.С. Механизмы синдрома системного воспалительного ответа после операций с применением искусственного кровообращения / Дис... доктора мед. наук. 2014. Т. 14. № 03.
4. Abbas A., Lichtman A., Pillai S. // Cellular and Molecular Immunology 9th edition. 2018. P. 62–65.
5. Козлов В.А., Тихонова Е.П., Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Андропова Н.В., Анисимова Е.Н., Головкин А.С., Демина Д.В., Здзитовецкий Д.Э., Калинина Ю.С., Каспаров Э.В., Козлов И.Г., Корсунский И.А., Кудлай Д.А., Кузьмина Т.Ю., Миноранская Н.С., Продеус А.П., Старикова Э.А., Черданцев Д.В., Чесноков А.Б., Шестерня П.А., Борисов А.Г. // Клиническая иммунология. Практическое пособие для инфекционистов. 2021. 550 с.
6. Каспаров Э.В., Савченко А.А., Кудлай Д.А., Кудрявцев И.В., Тихонова Е.П., Головкин А.С., Борисов А.Г. // Клиническая иммунология. Реабилитация иммунной системы. 2022. 196 с.
7. Черешнев В.А., Гусев Е.Ю. // Медицинская иммунология. 2012. Т. 14. № 1–2. С. 9–20.
8. Cavillon J.M., Annane D. // Journal of endotoxin research. 2006. V. 12. № 3. P. 151–170.
9. Chanput W., Mes J., Vreeburg R.A., Savelkoul H.F., Wichers H.J. // Food & function. 2010. V. 1. № 3. P. 254–261.
10. Zhang Y., Liu D., Chen X., Li J., Li L., Bian Z., Sun F., Lu J., Yin Y., Cai X., Sun Q., Wang K., Ba Y., Wang Q., Wang D., Yang J., Liu P., Xu T., Yan Q., Zhang J., Zen K., Zhang C.Y. // Molecular cell. 2010. V. 39. № 1. P. 133–144.
11. McDonald M.K., Tian Y., Qureshi R.A., Gormley M., Ertel A., Gao R., Aradillas Lopez E., Alexander M., Sacan A., Fortina P., Ajit S.K. // Pain. 2014. V. 155. № 8. P. 1527–1539.
12. Genin M., Clement F., Fattaccioli A., Raes M., Michiels C. // BMC Cancer. 2015. V. 15. № 1. P. 1–14.
13. Chanput W., Mes J., Savelkoul H.F., Wichers H.J. // Food & function. 2013. V. 4. № 2. P. 266–276.
14. Walsh S.A., Davis T.A. // Journal of Inflammation. 2022. V. 19. № 1. P. 6.
15. Rossaint J., Kühne K., Skupski J., Van Aken H., Looney M.R., Hidalgo A., Zarbock A. // Nature communications. 2016. V. 7. № 1. P. 13464.
16. Ohayon L., Zhang X., Dutta P. // Pharmacological research. 2021. V. 170. P. 105692.
17. Aires I.D., Ribeiro-Rodrigues T., Boia R., Ferreira-Rodrigues M., Girao H., Ambrosio A.F., Sant'ago A.R. // Biomolecules. 2021. V. 11. № 6. P. 770.
18. Hu Q., Su H., Li J., Lyon C., Tang W., Wan M., Hu T.Y. // Precision Clinical Medicine. 2020. V. 3. № 1. P. 54–66.
19. Doyle L.M., Wang M.Z. // Cells. 2019. V. 8. № 7. P. 727.
20. Zaborowski M.P., Balaj L., Breakefield X.O., Lai C.P. // Bioscience. 2015. V. 65. № 8. P. 783–797.
21. Howe K., Clark M.D., Torroja C.F., Torrance J., Berthelot C., Muffato M., Collins J.E., Humphray S., McLaren K., Matthews L. et al. // Nature. 2013. V. 496. № 7446. P. 498–503.
22. Zizioli D., Mione M., Varinelli M., Malagola M., Bernardi S., Alghisi E., Borsani G., Finazzi D., Monti E., Presta M., Russo D. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. 2019. V. 1865 № 3. P. 620–633.
23. Baranasic D., Hörtenhuber M., Balwierz P.J., Zehnder T., Mukarram A.K., Nepal C., Várnai C., Hadzhiev Y., Jimenez-Gonzalez A., Li N. et al. // Nature genetics. 2022. V. 54. № 7. P. 1037–1050.
24. Акино АД., Рубинштейн А.А., Головкин И.А., Турикова П.В., Трулев А.С., Кудрявцев И.В., Головкин А.С. // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2024. Опубликовано онлайн 07.12.2023
25. Dubashynskaya N.V., Bokatyi A.N., Golovkin A.S., Kudryavtsev I.V., Serebryakova M.K., Trulioff A.S., Dubrovskii Y.A., Skorik Y.A. // International Journal of Molecular Sciences. 2021. V. 22. № 20. P. 10960.

26. Kudryavtsev I., Kalinina O., Bezrukikh V., Melnik O., Golovkin A. // *Viruses*. 2021. V. 13. № 5. P. 767.
27. Kondratov K., Nikitin Y., Fedorov A., Kostareva A., Mikhailovskii V., Isakov D., Ivanov A., Golovkin A. // *Journal of extracellular vesicles*. 2020. V. 9. № 1. P. 1743139.
28. Fedorov A., Kondratov K., Kishenko V., Mikhailovskii V., Kudryavtsev I., Belyakova M., Sidorkevich S., Vavilova T., Kostareva A., Sirotkina O., Golovkin A. // *Platelets*. 2020. V. 31. № 2. P. 226–235.
29. 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. // *Journal of extracellular vesicles*. 2018. V. 7. № 1. P. 1535750.
30. Welsh J.A., Van Der Pol E., Arkesteijn G.J.A., Bremer M., Brisson A., Coumans F., Dignat-George F., Duggan E., Ghiran I., Giebel B., Görgens A., Hendrix A., Lacroix R., Lannigan J., Libregts SFWM, Lozano-Andrés E., Morales-Kastresana A., Robert S., De Rond L., Tertel T., Tigges J., De Wever O., Yan X., Nieuwland R., Wauben MHM, Nolan J.P., Jones J.C. // *Journal of extracellular vesicles*. 2020. V. 9. № 1. P. 1713526.
31. Welsh J.A., Arkesteijn G.J.A., Bremer M., Cimorelli M., Dignat-George F., Giebel B., Görgens A., Hendrix A., Kuiper M., Lacroix R., Lannigan J., van Leeuwen T.G., Lozano-Andrés E., Rao S., Robert S., de Rond L., Tang V.A., Tertel T., Yan X., Wauben M.H.M., Nolan J.P., Jones J.C., Nieuwland R., van der Pol E. // *Journal of Extracellular Vesicles*. 2023. V. 12. № 2. P. e12299.
32. Ма И., Федоров А.В., Кондратов К.А., Князева А.А., Васютина М.Л., Головкин А.С. // *Медицинская иммунология*. 2021. Т. 23. № 5. С. 1069–1078.
33. Singer M., Deutschman C.S., Seymour C.W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G.R., Chiche J.D., Coopersmith C.M., Hotchkiss R.S., Levy M.M., Marshall J.C., Martin G.S., Opal S.M., Rubenfeld G.D., van der Poll T., Vincent J.L., Angus D.C. // *Jama*. 2016. V. 315. № 8. P. 801–810.
34. Mira J.C., Gentile L.F., Mathias B.J., Efron P.A., Brakenridge S.C., Mohr A.M., Moore F.A., Moldawer L.L. // *Critical care medicine*. 2017. V. 45. № 2. P. 253–262.
35. Toliver-Kinsky T., Kobayashi M., Suzuki F., Sherwood E.R. // *Total burn care*. 2018. P. 205–220. e4.
36. 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. et al. // *Journal of extracellular vesicles*. 2015. V. 4. № 1. P. 27066.
37. Willekens F.L., Werre J.M., Kruijt J.K., Roerdinkholder-Stoelwinder B., Groenen-Döpp Y.A., van den Bos A.G., Bosman G.J., van Berkel T.J. // *Blood*. 2005. V. 105. № 5. P. 2141–2145.
38. Linxweiler J., Kolbinger A., Himbert D., Zeuschner P., Saar M., Stöckle M., Junker K. // *Cancers*. 2021. V. 13. № 19. P. 4937.
39. Morad G., Carman C.V., Hagedorn E.J., Perlin J.R., Zon L.I., Mustafaoglu N., Park T.E., Ingber D.E., Daisy C.C., Moses M.A. // *ACS nano*. 2019. V. 13. № 12. P. 13853–13865.
40. Banks W.A., Sharma P., Bullock K.M., Hansen K.M., Ludwig N., Whiteside T.L. // *International journal of molecular sciences*. 2020. V. 21. № 12. P. 4407.
41. Carata E., Muci M., Simona Di Giulio, Mariano S., Panzarini E. // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. V. 24. № 14. P. 11251.
42. Saint-Pol J., Gosselet F., Duban-Deweere S., Pottiez G., Karamanos Y. // *Cells*. 2020. V. 9. № 4. P. 851.
43. Kodidela S., Sinha N., Kumar A., Zhou L., Godse S., Kumar S. // *Scientific Reports*. 2023. V. 13. № 1. P. 3005.
44. Vakili S., Ahooyi T.M., Yarandi S.S., Donadoni M., Rappaport J., Sariyer I.K. // *Brain sciences*. 2020. V. 10. № 7. P. 424.
45. Sarkar A., Mitra S., Mehta S., Raices R., Wevers M.D. // *PloS one*. 2009. V. 4. № 9. P. e7140.
46. Ismail N., Wang Y., Dakhallah D., Moldovan L., Agarwal K., Batte K., Shah P., Wisler J., Eubank T.D., Tridandapani S., Paulaitis M.E., Piper M.G., Marsh C.B. // *Blood*. 2013. V. 121. № 6. P. 984–995.
47. Qu Y., Ramachandra L., Mohr S., Franchi L., Harding C.V., Nunez G., Dubyak G.R. // *The Journal of Immunology*. 2009. V. 182. № 8. P. 5052–5062.
48. Femminò S., Penna C., Margarita S., Comità S., Brizzi M.F., Pagliaro P. // *Vascular Pharmacology*. 2020. V. 135. P. 106790.
49. Schindler V.E.M., Alhamdan F., Preußer C., Hintz L., Alashkar Alhamwe B., Nist A., Stiewe T., Pogge von Strandmann E., Potaczek D.P., Thölken C., Garn H. // *Biomedicines*. 2022. V. 10. № 3. P. 622.
50. Słomka A., Urban S.K., Lukacs-Kornek V., Żekanowska E., Kornek M. // *Frontiers in immunology*. 2018. V. 9. P. 2723.
51. Caruso S., Poon I.K.H. // *Frontiers in immunology*. 2018. V. 9. P. 1486.
52. Sheikh N.A., Jones L.A. // *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2008. V. 57. № 9. P. 1381–1390.
53. Simak J., Gelderman M.P., Yu H., Wright V., Baird A.E. // *Journal of thrombosis and haemostasis*. 2006. V. 4. № 6. P. 1296–1302.
54. Lackner P., Dietmann A., Beer R., Fischer M., Broessner G., Helbok R., Schmutzhard E. // *Stroke*. 2010. V. 41. № 10. P. 2353–2357.
55. El-Gamal H., Parray A.S., Mir F.A., Shuaib A., Agouni A. // *Journal of Cellular Physiology*. 2019. V. 234. № 10. P. 16739–16754.

Extracellular Vesicles Secreted by the THP-1 Cells Influence on the Inflammation Gene Expression in Zebrafish

D. B. Sambur¹, O. V. Kalinina¹, A. D. Aquino¹, P. V. Tirikova¹, M. A. Migunova¹, E. E. Koroleva¹, A. S. Trulyov², A. A. Rubinshtein^{1,2}, I. V. Kudryavtsev^{1,2}, and A. S. Golovkin¹

¹Federal State Budgetary Institution "Almazov National Medical Research Center", St. Petersburg, Russia

²Federal State Budgetary Institution "Institute of Experimental Medicine", St. Petersburg, Russia

Extracellular vesicles secreted by immune cells may play a significant role in the initiation, maintenance, and progression of systemic inflammation. The aim of the study was to investigate the regulatory effect of extracellular vesicles (EVs) produced by activated monocyte-like THP-1 cells on expression levels of inflammatory genes in a zebrafish. Real-time PCR analysis was performed to investigate the relative expression levels of *il-1 β* , *il-6*, *tnf- α* , *ifn- γ* , *mpeg1.1*, *mpeg1.2*, *mpx*, and *il-10* genes in the brain, liver, and heart of zebrafish followed by intracelomic injection of EVs produced by THP-1 cells activated with tumor necrosis factor (TNF) and phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) at different concentrations. EVs, secreted by activated THP-1 cells with TNF at a concentration of 10 ng/mL and PMA at concentrations of 16 and 50 ng/mL, reduced the expression levels of *il-1 β* , *ifn- γ* , *tnf- α* , *mpx*, *mpeg1.1*, *mpeg1.2*, and *IL-10* genes in the brain, heart and liver of *Danio rerio*. Wherein, EVs secreted by THP-1 cells treated with TNF at doses of 10 and 20 ng/ml had opposite effects on the gene expression levels of *il-1 β* in the brain, *il-1 β* , *il-10*, and *il-6* in the heart; on *il-1 β* , *il-10*, *mpx*, and *mpeg1.2* in the liver. EVs secreted by THP-1 cells treated with PMA at doses of 16 and 50 ng/ml had opposite effects on the expression levels of *il-6* and *il-10* genes in the heart and *ifn- γ* gene in the liver. EVs, produced by activated THP-1 cells have a systemic effect on *Danio rerio* manifested in a changing of the expression level of pro- and anti-inflammatory cytokine genes in the brain, liver, and heart. The qualitative composition of the EVs produced by activate THP-1 cells varies depending on the type and dose of the used stimulus, that reflects on strength and direction of the effects detected *in vivo*.

Keywords: Extracellular vesicles, THP-1 cells, *Danio rerio*, zebrafish, gene expression

ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ НЕКОТОРЫХ НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКОЙ РТУТНОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ В ПОСТКОНТАКТНОМ ПЕРИОДЕ

© 2024 г. Г. М. Бодиенкова¹*, Е. В. Боклаженко¹

¹ФГБНУ «Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований», Ангарск, Россия

*E-mail: immun11@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.04.2023 г.

После доработки 18.05.2023 г.

Принята к публикации 19.05.2023 г.

Цель исследования заключалась в выявлении закономерностей изменения некоторых нейроспецифических белков (BDNF, S100β, ОБМ) в сыворотке крови пациентов с хронической ртутной интоксикацией (ХРИ) после прекращения воздействия токсиканта. В клинических условиях проведено обследование мужчин с установленным диагнозом ХРИ в отдаленном периоде после разобщения с токсикантом на химическом производстве. Концентрации нейроспецифических белков (BDNF, S100β, ОБМ) в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью коммерческих тест-систем ChemiKine (США), CanAg (Швеция) и AnshLabs (США) соответственно. Полученные результаты свидетельствуют и подтверждают прогрессивность болезненного процесса в отдаленном, постконтактном периоде хронической интоксикации ртутью, что соответствует клинике проявления заболевания. У пациентов с ХРИ через 5 лет разобщения с токсикантом зарегистрированы повышенные концентрации в сыворотке крови BDNF, белка S100β и ОБМ. Длительно сохраняющиеся высокие уровни нейротрофических белков могут отражать течение нейродеструктивных процессов, происходящих в нервной ткани, и прогрессирование заболевания. Дефицит BDNF у лиц с ХРИ, обследованных в связной выборке через 8 лет постконтактного периода, возможно, свидетельствует об ослаблении нейрогенеза. Дальнейшие исследования будут способствовать более точному определению и пониманию использования сывороточных концентраций BDNF, белка S100β, ОБМ в качестве маркеров активности патологического процесса и конкретной мишени для эффективного лечения.

Ключевые слова: мозгоспецифический нейротрофический фактор, белок S100β, общий белок миелина, хроническая ртутная интоксикация, постконтактный период

DOI: 10.31857/S1027813324010102, EDN: GYNKXW

ВВЕДЕНИЕ

До настоящего времени сохраняет свою актуальность проблема токсических поражений нервной системы парами металлической ртути, несмотря на значительное сокращение использования ее в технологических процессах. Особенно значимым аспектом проблемы является длительное течение нейроинтоксикации в постконтактном периоде, не приводящее к полному восстановлению здоровья, а в ряде случаев наблюдается ухудшение клинических проявлений в отдаленном периоде, затем прекращается взаимодействие с токсикантом [1]. При многих заболеваниях нервной системы, сопровождающихся деструктивными, демиелинизирующими процессами, отмечается выход нейронспецифических белков из поврежденных клеток нервной системы в интерстициальное пространство и далее

в биологические среды [2]. Одним из современных направлений нейрофизиологии является использование сывороточных концентраций нейроспецифических белков, в частности мозгового нейротрофического фактора (BDNF), белка S100β, общего белка миелина (ОБМ), в качестве маркеров нейробиологических изменений. В настоящее время установлено, что нарушение синтеза нейробелков наблюдается при развитии и течении многих патологических процессов (депрессивных расстройствах, шизофрении, инсульте, алкоголизме, болезнью Альцгеймера, Паркинсона, расстройствах аутистического спектра, невропатической боли и др.) [3, 4]. Продолжает находиться в стадии активного изучения детализация механизмов, лежащих в основе нейродеструктивных процессов при интоксикации ртутью. Это является необходимым для дальнейшего поиска и обоснования

патогенетических мишеней, определяющих новые подходы к диагностике и лечению нейроинтоксикаций. Одним из значимых биомаркеров неврологических расстройств является мозгоспецифический нейротрофический фактор (BDNF), сывороточный уровень которого, коррелируя с концентрацией в центральной нервной системе, может рассматриваться также как показатель эффективного лечения [5]. BDNF один из представителей группы подсемейства нейротрофинов, семейства факторов роста, белок из класса цитокинов, обладающий высокой функциональной активностью, которая значительно отличается в зависимости от стадии онтогенеза. BDNF участвует в развитии и сохранении нейрональных клеток мозга [6, 7]. Указанный нейротрофин может принимать участие как в формировании патологии нервной системы, так и в индукции толерантности мозга к стрессирующим факторам внешней и внутренней среды. В настоящее время подтверждена роль BDNF в регуляции нейрональной пластичности [8].

Наиболее специфичным белком мозговой ткани является широко известный мозгоспецифический белок S100 β , присутствующий в клетках головного мозга. Постоянство концентрации его обеспечивает нормальное функционирование всех систем головного мозга. Увеличение уровня S100 β в крови происходит вследствие структурно-функциональных повреждений, прежде всего глиальных клеток мозга, и повышения проницаемости ГЭБ. Через фосфорилирование других белков он принимает участие в передаче сигнала, обеспечивая тем самым пластические процессы [9]. Чувствительным маркером повреждения нервной ткани, проницаемости гематоэнцефалического барьера является один из ключевых структурно-функциональных компонентов миелиновой оболочки – общий белок миелина (ОБМ). Разрушение миелина является универсальным механизмом реакции нервной ткани на повреждение в результате дисрегуляции белково-липидного соотношения мембраны миелина. При повреждении ЦНС нарушается функция гематоэнцефалического барьера, что сопровождается повышением концентрации ОБМ в сыворотке крови [10, 11]. Кроме известных эффектов влияния нейротрофинов на нервную систему, в литературе имеются данные о множестве регуляторных влияний на иммунную систему [12]. Не исключена сопряженность указанных нейробелков со многими другими биорегуляторами, в частности с цитокинами, гормонами, сигнальными молекулами и др. Результаты ранее выполненных нами исследований работающих в условиях контакта с парами металлической ртути и пациентов с ХРИ в зависимости от выраженности патологического процесса свидетельствовали о нарушении адекватной работы механизмов цитокиновой регуляции, нейроаутоиммунного ответа. С нарастанием тяжести

патологического процесса изменяются динамика и взаимосвязь указанных показателей [13].

В этой связи перспективным является дальнейшее выяснение участия нейробелков в дифференцированном регулировании ответа нейронов различных областей мозга в отдаленном периоде после прекращения воздействия токсиканта и использование их в качестве маркеров диагностики и терапевтической мишени при заболеваниях нервной системы различного генеза. Тем более что в настоящее время активно разрабатываются инновационные технологии, направленные на применение нейроспецифических белков в целях модуляции патологического процесса [14].

Цель исследования – выявить закономерности изменения нейроспецифических белков (BDNF, S100 β , ОБМ) в сыворотке крови пациентов с хронической ртутной интоксикацией после прекращения воздействия токсиканта.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В стационарных условиях проведено обследование мужчин (возраст – 53.38 ± 0.82 года, стаж работы в контакте с токсикантом – 15.62 ± 0.8 лет) с установленным диагнозом профессиональной ХРИ ($n = 22$). В клинической картине обследованных лиц превалировала энцефалопатия, характеризующаяся преимущественно проявлением психических расстройств (чаще в виде органического астенического расстройства или органического расстройства личности с когнитивными и эмоционально-волевыми нарушениями различной степени выраженности). Группу сравнения составили мужчины ($n = 27$) сопоставимые по возрасту (47.2 ± 4.7 года) и общему трудовому стажу (14.2 ± 1.2 года), не имеющие клинических признаков острых или хронических заболеваний любой природы и контакта в условиях производства с химическими факторами. Лабораторные исследования выполнены в лаборатории иммунобиохимических и молекулярно-генетических исследований института. Клиническое обследование и постановка диагноза – в клинике института в соответствии с классификационными критериями болезней и состояний МКБ 10-го пересмотра. Концентрации нейрональных белков в сыворотке крови определяли стандартным методом твердофазного иммуноферментного анализа на высокоскоростном иммуноферментном анализаторе “Alisei”. Концентрацию BDNF в сыворотке крови определяли у 22 пациентов в связной выборке сразу после прекращения воздействия ртути, через 5 и 8 лет постконтактного периода с помощью тест-систем “ChemiKine Elisa”, США (каталожный № DBD 00). Сывороточные концентрации белков S100 β и ОБМ определяли у этих же пациентов только через 5 лет с использованием реактивов

фирмы CanAg, Швеция (каталожный № 708–10) и AnshLabs, США (каталожный № 931–1080) соответственно. Кровь для исследования у пациентов во все сроки наблюдения брали однократно при поступлении в стационар, до проведения лечения, натощак. Использовали пробирки “Vacutainer”, которые центрифугировали на лабораторной центрифуге ЦЛМН-Р10–01 (“Элекон-М”, Россия) при 1500 об/мин в течение 15 мин для получения сыворотки. Сыворотку отбирали в отдельные пробирки “Эппендорф” (Eppendorf) и хранили в низкотемпературном холодильнике (Sanyo, Япония) при температуре -70°C .

Полученные результаты обрабатывали статистически с помощью пакета прикладных программ “Statistica 6.0” (StatSoft, США). Возраст и стаж работы обследованных пациентов представлены в виде средней (M) и ее ошибки (m). Проверку нормальности распределения переменных выполняли с использованием критерия Шапиро – Уилкса. Данные представлены в виде медианы (Me), нижнего (Q_{25}) и верхнего (Q_{75}) квартилей. Для определения значимости между независимыми выборками при ненормальном распределении использовали критерий Манна – Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что гиперактивация в иммунной системе и процесс нейровоспаления приводят к дисрегуляции отдельных нейроспецифических белков, способствуют ослаблению нейрогенеза, а также развитию процессов дегенерации [14]. Ранее выполненные исследования позволили зарегистрировать изменения в содержании BDNF и белка S100 β в сыворотке крови работающих в период воздействия паров металлической ртути в условиях производства, которые изменялись в зависимости от тяжести течения патологического процесса [15, 16].

Наблюдение за пациентами в динамике после прекращения производственного контакта с ртутью показало, что в течение 5 лет уровни BDNF статистически значимо не изменялись и оставались на прежнем высоком относительно контроля (659.20 (443.60–776.20) пг/мл) уровне. Медианные значения указанного показателя составили 1176.20 (535.60–1781.10) пг/мл против 989.95 (803.30–1209.20) пг/мл сразу после прекращения контакта с токсикантом. А через последующие 3 года наблюдалось снижение концентраций до 370.51 (59.33–1256.57) пг/мл как относительно первого ($p = 0.001$), так и второго ($p = 0.003$) обследования в постконтактном периоде, а также по сравнению с контрольной группой 473.80 (262.30–797.00) пг/мл. Дефицит нейротрофинов и ослабленный нейрогенез способствуют более быстрой гибели клеток гиппокампа

и вызывают пластические перестройки [17]. Что касается эндогенного белка S100 β , то в исследованиях, выполненных ранее, показано статистически значимое возрастание его у стажированных рабочих (83.38 ± 4.64 нг/л) и пациентов с ХРИ (95.60 ± 5.61 нг/л) при сопоставлениях с работающими вне контакта с нейротоксикантами (64.93 ± 2.68 нг/л). Причем наиболее выраженное повышение белка S100 β отмечено при ХРИ [18]. В результате обследования пациентов с ХРИ через 5 лет после прекращения контакта с ртутью зарегистрированы также статистически значимо высокие медианные значения показателя (85.62 (73.83 – 118.30 нг/л)) относительно группы сравнения (63.46 (43.80 – 89.34 нг/л); $p = 0.03$). Учитывая факт того, что протеины S100 β могут участвовать в воспалительных реакциях, регулировать дифференцировку глии и нейронов, запускать программируемую смерть клеток, есть основания полагать, что в нашем случае уровень белка S100 β может отражать степень выраженности патологического процесса.

Результаты определения и оценки сывороточных концентраций одного из маркеров деструкции миелина ОБМ у лиц с ХРИ через 5 лет после прекращения контакта с парами металлической ртути свидетельствуют о его повышенных значениях по сравнению с группой сравнения более чем в 2 раза (1.13 (0.45 – 1.85 нг/л) против 0.49 (0.16 – 0.81 нг/л) в контроле; $p = 0.04$). Сразу после прекращения воздействия ртути концентрации указанного белка у лиц с ХРИ не определяли, но, тем не менее, можно предположить их нарастание у работающих в условиях воздействия токсиканта. Об этом отчасти могут свидетельствовать зарегистрированные корреляции между уровнями АТ к отдельным нейроспецифическим белкам, в том числе к ОБМ, и скоростью проведения импульсов по аксонам различных структур периферической нервной системы, что подтверждает значимость этого показателя в диагностике активности демиелинизирующих процессов при ХРИ в отдаленном периоде [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют и подтверждают прогрессивность болезненного процесса в отдаленном периоде интоксикации ртутью, что соответствует клинике проявления заболевания. У пациентов с ХРИ через 5 лет разобщения с токсикантом зарегистрированы повышенные концентрации в сыворотке крови BDNF, белка S100 β и ОБМ. Длительно сохраняющиеся высокие уровни нейротрофических белков могут свидетельствовать о прогрессировании заболевания. Дефицит BDNF в отдаленном постконтактном периоде (через 8 лет) возможно отражает ослабление нейрогенеза. Дальнейшие исследования будут

способствовать более точному определению и пониманию использования сывороточных концентраций BDNF, белок S100 β , ОБМ в качестве маркеров активности патологического процесса и конкретной мишени для эффективного лечения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет финансовых средств, выделенных в рамках Государственного задания ФГБНУ ВСИМЭИ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Обследование пациентов соответствовало этическим стандартам в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (2000) и “Правилами клинической практики в Российской Федерации”, утвержденными приказом Минздрава России от 19.06.2003 № 266.

Информированное согласие. Исследования выполнены с информированного согласия пациентов на участие в них и одобрено Этическим комитетом ВСНЦ ЭЧ СО РАМН (Протокол № 5 от 14.11.2012).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Лахман О.Л., Рукавишников В.С., Шахметов С.Ф., Соседова Л.М., Катаманова Е.В., Бодиенкова Г.М., Кудяева И.В., Шевченко О.И., Русанова Д.В., Журба О.М.* // Медицина труда и промышленная экология. 2015. № 9. С. 82–83.
2. *Астахин А.В., Евлашева О.О., Левитан Б.Н.* // Астраханский медицинский журнал. 2015. Т. 10. № 2. С. 42–46.
3. *Левчук Л.А., Вялова Н.М., Михалицкая Е.В., Семкина А.А., Иванова С.А.* // Современные проблемы науки и образования. 2018. № 6. С. 58.
4. *Бодиенкова Г.М., Курчевенко С.И.* // Медицина труда и промышленная экология. 2014. № 4. С. 34–37.
5. *Lopresti A.L., Maker G.L., Hood S.D., Drummond P.D.* // Prog. Neuropsychopharmacol Biol. Psychiatry. 2014. V. 48. P. 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbpb.2013.09.017>
6. *Woolf C.J., Salter M.W.* // Science. 2000. V. 288. № 5472. P. 1765–1768. <https://doi.org/10.1126/science.288.5472.1765>
7. *Colucci-D'Amato L., Speranza L., Volpicelli F.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 20. P. 7777. <https://doi.org/10.3390/ijms21207777>
8. *Dwivedi Y.* // Neuropsychiatric Disease and Treatment. 2009. V. 5. P. 433–449. <https://doi.org/10.2147/ndt.s5700>
9. *Ермаков С.В., Можейко Р.А., Батуринов В.А., Белоконь О.С.* // Вестник современной клинической медицины. 2018. Т. 11. № 6. С. 11–15.
10. *Астахин А.В., Евлашева О.О., Левитан Б.Н.* // Астраханский медицинский журнал. 2016. Т. 11. № 4. С. 9–17.
11. *Усманова Д., Маджидова Ё.Н.* // Сибирское медицинское обозрение. 2017. № 1(103). С. 60–63. <https://doi.org/10.20333/2500136-2017-1-60-63>
12. *Кутикова О. Ю., Novgorodtseva T.P., Antonyuk M.V., Gvozdenko T.A.* // Bulletin of Siberian Medicine. 2021. V. 20. № 1. P. 158–167. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2021-1-158-167>
13. *Бодиенкова Г.М., Боклаженко Е.В.* // Нейрохимия. 2021. Т. 38. № 4. С. 385–390. <https://doi.org/10.31857/S1027813321040026>
14. *Липатова Л.В., Серебрянная Н.Б., Капустина Т.В., Сивакова Н.А.* // Аллергология и иммунология. 2017. Т. 18. № 1. С. 60.
15. *Бодиенкова Г.М., Боклаженко Е.В.* // Успехи современного естествознания. 2015. № 5. С. 105–108.
16. *Бодиенкова Г.М., Боклаженко Е.В.* // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2011. № 3–2 (79). С. 140–143.
17. *Григорьян Г.А., Дыгало Н.Н., Гехт А.Б., Степанчев М.Ю., Гуляева Н.В.* // Успехи физиологических наук. 2014. Т. 45. № 2. С. 3–19.
18. *Боклаженко Е.В., Бодиенкова Г.М.* // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2010. № 1 (71). С. 14–16.
19. *Боклаженко Е.В., Бодиенкова Г.М., Русанова Д.В.* // Медицинская иммунология. 2019. Т. 21. № 6. С. 1197–1202. DOI: 10.15789/1563-0625-2019-6-1197-1202.

Patterns of Changes in Certain Neurospecific Proteins in Patients with Post-Contact Period Chronic Mercury Intoxication

G. M. Bodienkova¹ and E. V. Boklazhenko¹

¹Federal State Budgetary Scientific Institution “East-Siberian Institute of Medical and Ecological Research”, Angarsk, Russia

The aim of the study was to identify patterns of change in certain neurospecific proteins (BDNF, S100 β , MBP) in the serum of patients with chronic mercury intoxication (CMI) after stopping exposure to

the toxicant. In clinical conditions, men with an established diagnosis of chronic mercury intoxication were examined in a distant period after isolation from a toxicant in chemical production. Serum concentrations of neurospecific proteins (BDNF, S100 β , MBP) were determined by solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay using a commercial test-systems of ChemiKine (USA), CanAg (Sweden) and AnshLabs (США) respectively. The obtained results indicate and confirm the progressionality of the disease process in the distant, post-exposure period of chronic mercury intoxication, which corresponds to the clinic of the manifestation of the disease. Elevated serum concentrations of BDNF, S100 β protein, and MBP were reported in patients with CMI after 5 years of exposure to the toxicant. Long-lasting high levels of neurotrophic proteins may reflect the course of neurodestructive processes occurring in the nervous tissue and the progression of the disease. BDNF deficiency in CMI individuals examined in a linked sample at 8 years post-exposure may be indicative of attenuation of neurogenesis. Further studies will contribute to a more accurate definition and understanding of the use of serum concentrations of BDNF, S100 β protein, MBP as markers of pathological process activity and a specific target for effective treatment.

Keywords: brain-specific neurotrophic factor, S100 β protein, myelin basic protein, chronic mercury intoxication, post-contact period