

СОДЕРЖАНИЕ

Том 39, номер 3, 2022

Роль пренатального стресса в развитии нейродегенеративных заболеваний (спецвыпуск)

Редакторы А. В. Арутюнян и Н. Н. Наливаева

Обзоры

Влияние пренатальной гипоксии на метаболизм белка-предшественника амилоида
Н. Н. Наливаева 195

Экспериментальные работы

Оценка возможной коррекции нарушений глюкокортикоидной системы гиппокампа крыс, вызванных пренатальной гипоксией
О. В. Ветровой, В. А. Стратилов, Е. В. Ломерт, Е. И. Тюлькова 205

Влияние пренатального стресса на активность глутатионзависимых антиоксидантных ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии неокортекса у крыс в период интенсивной миелинизации
А. В. Вьюшина, А. В. Притворова, О. Г. Семенова, Н. Э. Ордян 210

Действие гипергомоцистеинемии на содержание нейротрофинов в структурах мозга беременных крыс
Ю. П. Милютина, А. В. Арутюнян, А. Д. Шербицкая, И. В. Залозная 217

Особенности продукции и трансплацентарного переноса тиреоидных гормонов в системе “мать-плод” при гипергомоцистеинемии
А. Д. Шербицкая, А. А. Коваленко, Ю. П. Милютина, Д. С. Васильев 228

Уровень карбонилирования белков и активность протеаз в мозге новорожденных крыс с пренатальной гипергомоцистеинемией
А. В. Яковлев, С. А. Дмитриева, А. Н. Краснова, О. В. Яковлева, Г. Ф. Ситдикова 243

Регулярные статьи

Обзоры

Роль инфламмасом в патогенезе нейродегенеративных заболеваний
Д. В. Шевчук, А. А. Абрамова, М. Н. Захарова 251

Роль полиаминов в механизмах когнитивных нарушений
*М. Г. Маклецова, Г. Т. Рихирева, Е. Ю. Кириченко,
И. Ю. Тринитатский, М. Ю. Вакуленко, А. М. Ермаков* 265

Экспериментальные работы

Ранний провоспалительный стресс влияет на социальное поведение взрослых крыс: эффекты пола и базового уровня интерлейкина 1-бета в крови
Н. Д. Брошевицкая, И. В. Павлова, М. И. Зайченко 279

Анальгетическая активность пальмитоилэтаноламида при развитии нейропатической боли у крыс
*Д. Н. Ивашкевич, И. В. Манжуло, А. И. Пономаренко,
А. А. Тьртышная, И. В. Дюйзен* 288

Клиническая нейрохимия

Сопряженность некоторых иммунологических показателей с распределением уровня постоянного потенциала головного мозга при нейросенсорной тугоухости
Г. М. Бодиенкова, О. Л. Лахман, Е. В. Боклаженко, О. И. Шевченко 299

Contents

Vol. 39, no. 3, 2022

The Role of Prenatal Stress in the Development of Neurodegenerative Diseases

(Special Issue)

Eds. A. V. Arutjunyan and N. N. Nalivaeva

Review Articles

- Effect of Prenatal Hypoxia on Amyloid Precursor Protein Metabolism
N. N. Nalivaeva 195
-

Experimental Articles

- Possible Correction of Impaired Hippocampal Glucocorticoid System
in Rats Induced by Prenatal Hypoxia
O. V. Vetrovoy, V. A. Stratilov, E. V. Lomert, and E. I. Tyulkova 205
- The Effect of Prenatal Stress on Glutathion-Associated Antioxidant Enzyme Activity
in Subcellular Fractions of Neocortical Neurons and Neuroglia
of Rats during the Period of Intensive Myelination
A. V. Vyushina, A. V. Pritvorova, O. G. Semenova, and N. E. Ordyan 210
- The Effect of Hyperhomocysteinemia on the Content of Neurotrophins
in Brain Structures of Pregnant Rats
Yu. P. Milyutina, A. V. Arutjunyan, A. D. Shcherbitskaya, and I. V. Zaloznyaya 217
- Thyroid Hormone Production and Transplacental Transfer in the “Mother-Fetus”
System during Gestational Hyperhomocysteinemia
A. D. Shcherbitskaia, A. A. Kovalenko, Yu. P. Milyutina, and D. S. Vasilev 228
- Levels of Protein Carbonylation and Activity of Proteases in the Brain
of Newborn Rats with Prenatal Hyperhomocysteinemia
*A. V. Yakovlev, S. A. Dmitrieva, A. N. Krasnova,
O. V. Yakovleva, and G. F. Sitdikova* 243
-

Regular Articles

Review Articles

- The Role of Inflammasomes in the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases
D. V. Shevchuk, A. A. Abramova, and M. N. Zakharova 251
- The Role of Polyamines in the Mechanisms of Cognitive Impairment
*M. G. Makletsova, G. T. Rikhireva, E. Yu. Kirichenko,
I. Yu. Trinitatsky, M. Yu. Vakulenko, and A. M. Ermakov* 265
-

Experimental Articles

- Early Proinflammatory Stress Affects the Social Behavior of Adult Rats: Effects
of Sex and the Baseline Level of Interleukin 1-Beta in the Blood
N. D. Broshevitskaya, I. V. Pavlova, and M. I. Zaichenko 279
- Analgesic Activity of Palmitoylethanolamide on Neuropathic Pain in Rats
*D. N. Ivashkevich, I. V. Manzhulo, A. I. Ponomarenko,
A. A. Tyrtysnaia, and I. V. Dyuzhen* 288
-

Clinical Neurochemistry

- Comparative Assessment of Neurochemical Indicators in Patients
with Occupational Pathology Due To Physical and Chemical Factors
G. M. Bodienkova and E. V. Boklazhenko 299
-
-

УДК 557.1,557.15,577.2.04,557.25

ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ НА МЕТАБОЛИЗМ БЕЛКА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА АМИЛОИДА

© 2022 г. Н. Н. Наливаева^{1, 2, *}

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

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

Поступила в редакцию 25.04.2022 г.

После доработки 03.05.2022 г.

Принята к публикации 04.05.2022 г.

Конститутивный трансмембранный белок-предшественник амилоида (amyloid precursor protein, APP) является не только одним из определяющих факторов патогенеза болезни Альцгеймера (БА), но также важным регуляторным белком, определяющим развитие нервной системы и ее нормальное функционирование, начиная с самых ранних стадий эмбриогенеза. Продукты протеолитического расщепления APP, включая его N-концевые фрагменты, амилоидный пептид A β , а также внутриклеточный домен APP (AICD) обладают целым рядом важных свойств, определяющих миграцию нервных клеток, синаптогенез, пластичность нервной ткани, работу ионных каналов и внутриклеточную сигнализацию, а также экспрессию нейрональных генов. Характер экспрессии APP и его метаболизма в эмбриональный период и действие на эти процессы различных неблагоприятных факторов определяют динамику развития мозга, а также обуславливают паттерн его функционирования во время всей постнатальной жизни организма. Задачей данного обзора является анализ накопленных к настоящему времени сведений о влиянии пренатальной гипоксии на уровень экспрессии APP и его метаболизма в нервной ткани, а также развитие патогенеза БА.

Ключевые слова: белок-предшественник амилоида, болезнь Альцгеймера, гипоксия, нервная система, нейродегенерация, онтогенез, пренатальный стресс, протеолиз, развитие

DOI: 10.31857/S1027813322030086

СТРОЕНИЕ APP И ПОДОБНЫХ ЕМУ БЕЛКОВ

Белок-предшественник амилоида (amyloid precursor protein, APP) является конститутивным трансмембранным белком первого типа (C-концевой фрагмент обращен в цитоплазму клеток) и состоит из 695–770 аминокислот. APP принадлежит к большому эволюционно консервативному семейству белков и экспрессируется в различных клетках и тканях животных разного уровня эволюционного развития (для обзора см. [1, 2]). Особое внимание к изучению APP привлекает тот факт, что он является источником амилоидного A β пептида, и мутации в его гене приводят к развитию ранних семейных форм болезни Альцгеймера (БА) [3]. В клетках млекопитающих помимо APP присутствуют также его гомологи, называемые APP-подобными белками, APLP1 и APLP2 [4].

Ген APP человека локализован на 21-й хромосоме и содержит 18 экзонов, среди которых экзоны 7 и 8 подвержены альтернативному сплайсингу, хотя имеются данные о большем числе возможных мо-

лекулярных вариантов APP в связи с альтернативным сплайсингом экзона 15 [5]. Самая длинная изоформа APP человека и крысы содержит 770 аминокислот (APP₇₇₀), в то время как отсутствие экзона 7, кодирующего домен ингибитора сериновых протеаз типа Кунитца (KPI), приводит к образованию APP₇₅₁, а экзонов 7 и 8 (кодируют домен антигена OX-2) – APP₆₉₅ (рис. 1). Сходная организация экзонов также характерна для APP мыши и свиньи [6]. В нейронах, в основном, присутствует APP₆₉₅ вариант, молекула которого не содержит на своем N-концевом участке доменов OX-2 KPI. Хотя роль этих доменов до конца не ясна, есть данные, что повышенное содержание KPI-содержащей APP₇₅₁ изоформы приводит к нарушению функций митохондрий в нейрональных клетках [7]. В коре мозга человека соотношение различных форм APP составляет APP₆₉₅ : APP₇₅₁ : APP₇₇₀ = 20 : 10 : 1 [8]. При этом содержание более длинных изоформ APP повышено в мозге пациентов с БА [9, 10].

Большая часть молекулы APP, а именно ее N-концевой фрагмент, находится во внеклеточном пространстве или повернут внутрь клеточных ор-

* Адресат для корреспонденции: 194223 Россия, Санкт-Петербург, пр. Тореза 44; e-mail: natalia.nalivaeva@outlook.com.

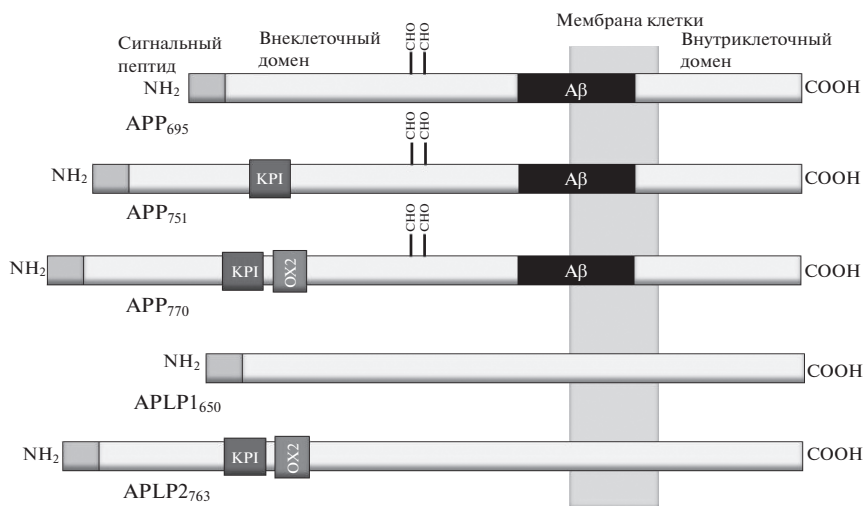


Рис. 1. Структура молекул основных представителей семейства APP. Белок-предшественник амилоида – APP, представлен тремя изоформами, содержащими 695, 751 и 770 аминокислотных остатков и отличающимися наличием KPI и/или OX2 доменов. Два APP-подобных белка, APLP1 и APLP2, содержат 650 и 763 аминокислоты, соответственно, и также различаются наличием KPI и OX2 доменов. CHO – сайты гликозилирования. APLP1 и APLP2 не содержат последовательности, соответствующей амилоидному пептиду Aβ. APP₆₉₅ является основной изоформой APP, экспрессируемой в нейронах.

ганелл, в то время как короткий С-концевой фрагмент молекулы находится в цитоплазме клеток. Трансмембранный домен, который включает в себя часть последовательности амилоидного пептида, также содержит сайт связывания с G-белками [11], а также холестерин [12]. APP подвергается пост-трансляционным изменениям в виде гликозилирования и фосфорилирования, которые существенным образом изменяют топографию этого белка в клетках и его протеолитический процессинг [13]. APLP1 and APLP2 также подвергаются гликозилированию, что влияет на характер их протеолиза [14].

Молекула APP содержит в составе N-концевого фрагмента также участки связывания гепарина [15] и ионов металлов, в частности меди и цинка, которые важны для димеризации его молекул [16]. N-концевая часть молекулы APP также включает цистеин-обогащенный глобулярный домен E1, кислотный домен (AC) и α-спиральный участок (E2) [17]. Консервативный мотив YENPTY в составе С-концевого участка APP обуславливает его внутриклеточные взаимодействия с другими белками и регуляцию клеточных функций [18].

Синтез и протеолитический процессинг APP

Полноразмерная молекула APP синтезируется из мРНК в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), где также происходят ее пост-трансляционные модификации, и далее транспортируется через конститутивную везикулярную систему Гольджи в плазматические мембраны клеток [19, 20]. В ЭР в основном обнаруживают незрелые N-гли-

козилирование формы APP, в то время как дополнительное O-гликозилирование и формирование зрелой молекулы происходит в системе транс-Гольджи [21]. Нарушение процессов пост-трансляционных модификаций APP приводит к изменению его присутствия в разных компартментах клеток и на их поверхности, приводя к изменению клеточных функций [22].

Метаболизм и функции APP регулируются при помощи его направленного протеолиза под действием ряда специфических ферментов, носящих название “секретаз”. Они расщепляют этот трансмембранный белок с образованием ряда важных биологически активных продуктов. В настоящее время известно несколько сайтов расщепления APP, из которых основными являются сайты действия α-, β- и γ-секретаз [23]. Они способны расщеплять APP с образованием фрагментов разной длины, обладающих определенными функциональными свойствами (см. рис. 2). В результате действия α- или β-секретаз образуются крупные растворимые белки sAPPα и sAPPβ, играющие важную роль в процессах пролиферации нервных клеток и развитии нервной ткани [24, 25], а также мембраносвязанные фрагменты C83 и C99, соответственно. В результате расщепления фрагмента C99 под действием γ-секретазы внутриплазматической мембраны образуется Aβ и короткий цитоплазматический фрагмент AICD, играющий важную роль в регуляции экспрессии нейрональных генов [26, 27]. При расщеплении γ-секретазой фрагмента C83 образуются короткий пептид p3 с неизвестными функциями и AICD,

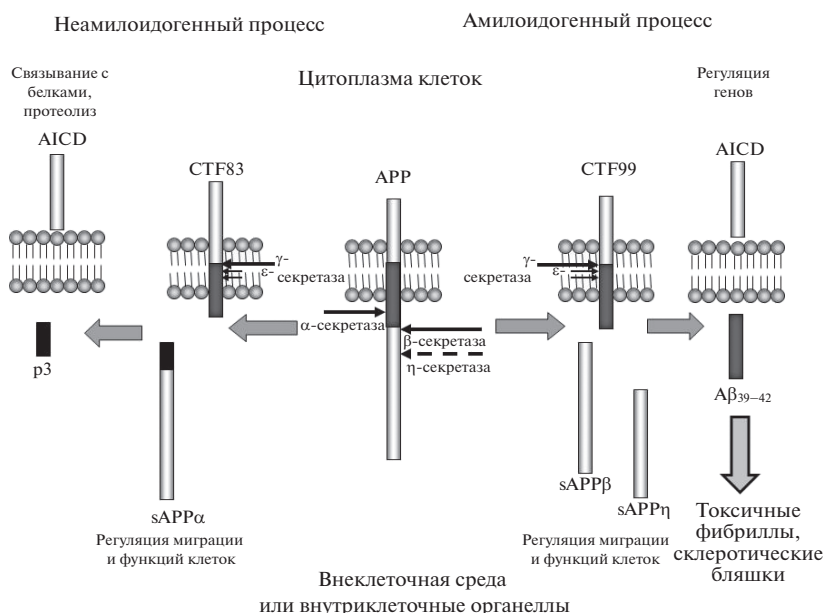


Рис. 2. Амилоидогенный и неамилоидогенный пути расщепления APP. Большая часть молекул APP (до 95%) расщепляется по неамилоидогенному пути под действием α-секретазы. При этом образуются растворимый секретуемый фрагмент sAPPα и связанный с мембраной C-концевой фрагмент C83, из которого под действием γ-секретазного комплекса образуется AICD и короткий нетоксичный пептид p3. Амилоидогенный путь начинается с расщепления APP β-секретазой (BACE1) с образованием растворимого sAPPβ и связанного с мембраной C-концевого фрагмента C99, из которого в результате действия γ-секретазы образуется Aβ и транскрипционно активный AICD. AICD, образованный по α-секретазному пути связывается с другими белками и подвергается протеолизу. Указаны также альтернативные сайты расщепления APP η-секретазой, а также ε-сайт расщепления γ-секретазой.

который быстро подвергается протеолитическому расщеплению [28, 29].

APP также может расщепляться по альтернативным путям под действием η- и δ-секретаз [30, 31], действие которых приводит к изменению спектра метаболитов APP и может способствовать усилению патогенеза БА. Также большое внимание привлекает процесс расщепления APP по ε-сайту [32], поскольку он напоминает процесс расщепления Notch с образованием внутриклеточного домена NICD, играющего роль важного транскрипционного фактора, регулирующего множественные процессы развития органов и тканей [33]. Расщепление APP по γ- и ε-сайтам имеет разнонаправленное физиологическое значение [34].

Таким образом, выделяют два основных пути катаболизма APP – амилоидогенный (в результате действия β- и γ-секретаз) с образованием Aβ, и неамилоидогенный, в котором принимает участие α-секретазы, поскольку она расщепляет APP внутри последовательности Aβ между лизином и лейцином в положении 16 и 17 [35], предотвращая образование Aβ пептида. Основным отличием APLP1 и APLP2 от APP является то, что фрагменты их молекул, образующиеся в результате протеолитического расщепления и соответствующие последовательности амилоидного пептида в молекуле APP, не образуют амилоидных депозитов

из-за отсутствия в них домена, кодирующего этот пептид [36].

В настоящее время известно несколько протеолитических ферментов, обладающих α-секретазной активностью. В основном это цинк-зависимые металлопротеиназы, принадлежащие к семейству ADAM (*a disintegrin and metalloprotease*), в частности ADAM10 и ADAM17 (для обзора см. [37]). Процесс превращения APP под действием α-секретазы является конститутивным и по нему происходит расщепление до 90% всего клеточного APP [38], а образуемый растворимый фрагмент sAPPα оказывает важные нейрорегуляторные эффекты, особенно в процессе развития и функционирования мозга [24, 39]. Расщепление APP по η-секретазному пути также происходит под действием мембраносвязанной матричной металлопротеиназы MT5-MMP [30], в то время как δ-секретазой является цистеиновая аспарагин-эндопептидаза (AEP) [31].

Процессинг APP по амилоидогенному пути начинается с действия β-секретазы или BACE1 (*β-site APP-cleaving enzyme*), которая относится к семейству аспартатных протеаз [40]. Протеолитическое расщепление образованного при этом мембраносвязанного C-концевого фрагмента APP C99 происходит под действием комплекса мембраносвязанных белков, получившего название

γ -секретазы. В его состав входят пресенилины 1 и 2 (PS1 и PS2), никастрин (NCT) и белки Aph-1 и Pen-2 (для обзора см. [41]). Компонент γ -секретазы PS1 также принимает участие в протеолитическом расщеплении сигнальных молекул Notch и VEGF, играющих важную роль в развитии ЦНС [42, 43].

При определенных патологических условиях APP, помимо секретаза, может также подвергаться альтернативному протеолизу под действием каспазы-3 и каспазы-8 [44]. Расщепление под действием каспаз происходит внутри цитоплазматического домена молекулы APP в районе аспартата 664 (в молекуле APP₆₉₅). Продукты протеолиза APP каспазами являются очень токсичными [45]. В нормально функционирующих клетках фосфорилирование APP по остатку треонина в положении 668 защищает его от действия каспаз [46]. При определенных условиях, в частности при гипоксии, каспазы также расщепляют AICD [28], который принимает участие в регуляции экспрессии ряда генов, в частности амилоид-деградирующей нейрорепептидазы неприлизина (НЕП) [47].

С момента открытия гена APP в 1987 году [48] достигнут значительный прогресс в понимании его строения и регуляции в связи с патогенезом БА [49–50]. Строение локуса гена APP является сложным и содержит множество регуляторных областей, которые объясняют изменчивость спектра его изоформ, а также мутаций, приводящих к усиленному амилоидогенезу [51].

Регуляция системы синтеза и расщепления APP включает в себя также микро-РНК (для обзора см. [52]), список которых постоянно расширяется. Их спектр изменяется при развитии нейродегенеративных процессов и БА [53]. В частности, показана роль miR-29a/b и miR-298 в синтезе BACE1 и расщеплении APP [54, 55].

РОЛЬ APP В РАЗВИТИИ МОЗГА И НЕЙРОНАЛЬНОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ

Анализ последовательности белков суперсемейства APP предполагает, что нормальная функция APP связана с субстратной адгезией и межклеточными взаимодействиями [56, 57]. Отсутствие гена APP, а также APLP1 или APLP2 у нокаутных мышей не влияет на их жизнеспособность, и только двойные (APP^{-/-}APLP2^{-/-} или APLP1^{-/-}APLP2^{-/-}) или тройные нокауты по этим генам приводят к летальности в раннем постнатальном периоде [58]. Тем не менее у APP-КО мышей наблюдается замедленное развитие и снижение веса мозга и тела, пониженная мышечная сила и изменение локомоторной активности, нарушенная долговременная потенция (LTP), повышенная эпилептогенная готовность, а также нарушения гомеостаза меди и липидов [59]. С другой стороны,

при трисомии 21, характерной для синдрома Дауна, наличие трех копий гена APP приводит к нарушению развития, когнитивным изменениям и патогенезу БА [60].

Имеющиеся данные подтверждают, что в развивающемся мозге APP требуется для правильной миграции предшественников нейронов в зарождающейся кортикальной пластине [61]. Для осуществления этой функции APP необходимо его связывание с белком DISC-1, и нарушение их взаимодействия приводит к развитию шизофрении [62]. Более того белки панкортинины, экспрессируемые в развивающихся и зрелых нейронах головного мозга, снижают активность β -секретазы, взаимодействуют с APP и регулируют миграцию нейрональных клеток [63]. APP также играет важную роль в развитии стволовых клеток посредством их взаимодействия с APP связывающим белком APP-BP1. У крыс высокая экспрессия APP-BP1 наблюдается в эмбриональном мозге и в ранний постнатальный период (до P12) и существенно снижается с возрастом [64]. При этом во время эмбриогенеза изоформа APP₆₉₅ является основной формой, участвующей в созревании мозга [65]. Во взрослом мозге APP также играет важную роль в росте аксонов и восстановлении функций нейронов после травм [66].

Поскольку APP взаимодействует с широким спектром белков его интерактом играет важную роль в обеспечении сигнальных эффектов различных лигандов. Повышение уровня APP во время синаптогенеза указывает на его роль в формировании нейрональных сетей мозга. Конфокальный микроскопический анализ в первичных нейронах показал ко-локализацию APP с синаптическими везикулами, где он связывается с резидентным белком синаптоагмином-1, и возможно, участвует в регуляции их экзоцитоза [67].

Кроме того, APP имеет общие лиганды с белками, опосредующими активацию липопротеиновых рецепторов (LRP), в частности, с риелином, регулирующим миграцию нейронов во время эмбрионального развития и модулирующим синаптическую передачу во взрослом мозге [68]. Помимо развития мозга, APP также необходим для образования нервно-мышечных соединений, где он ко-локализован с ацетилхолиновыми рецепторами [69]. Более того, APP также взаимодействует с сигнальным белком агрином, который необходим для формирования и поддержания функционально активных нервно-мышечных соединений [70].

Еще одной важной нейрональной функцией APP является поддержание уровня кальция и его осцилляций, необходимых для синаптической передачи в нейрональных цепях [71]. Однако, чрезмерная экспрессия APP ингибирует спонтанные осцилляции кальция в культуре кортикальных ней-

ронов крыс и для стабилизации этого процесса важную роль играет фосфорилирование T668 во внутриклеточном домене APP [72].

Как было показано в исследованиях на трансгенных животных, APP и APLP2 необходимы в синапсах периферической и центральной нервной системы для пространственного обучения и LTP [73]. Нокаут генов APP и/или APLP2 не привел к снижению числа нервных клеток и возбуждающих нейронах в переднем мозге, а также к апоптозу или глиозу в течение всего постнатального периода, однако у таких мышей наблюдались существенные нарушения синаптической пластичности в гиппокампе, а также дефицит обучения и памяти. При этом повышенная возбудимость снижалась при блокаде Kv7 каналов, что предполагает участие APP в регуляции возбудимости нейронов через этот тип калиевых каналов [74].

Среди многочисленных физиологических функций, приписываемых APP, еще одна связана с его ферроксидазной активностью и регуляцией гомеостаза железа [75]. Поскольку ионы железа регулируют экспрессию мРНК APP [76] это предполагает наличие механизма обратной связи в регуляции синтеза APP. Более того, показано, что ионы меди и цинка принимают участие в димеризации APP и APLP, которое играет важную роль в регуляции синаптической активности [77].

Имеются также данные о том, что APP может действовать как рецептор, сопряженный с G-белками, в частности G α o [78], и посредством этих взаимодействий APP регулирует направленную миграцию нейронов [79].

В нервных клетках APP локализуется не только в плазматической мембране, но также и в митохондриях в результате дерегуляции его внутриклеточного транспорта [80]. Накопление APP и A β , наблюдаемое в митохондриях клеток у трансгенных мышей и пациентов с БА, объясняет нарушение энергетического обмена и гибель нервных клеток, приводящее к БА [81].

В дополнение к перечисленным выше функциям APP также принимает участие в регуляции экспрессии генов как при участии его цитоплазматического домена AICD (НЕП, транстиретин и многие другие [82]), так и целой молекулы (АХЭ [83], EGF [84], инсулин-деградирующий фермент и деацетилазы гистонов [85]).

Анализ содержания мРНК изоформ APP в развивающемся мозге крыс свидетельствует, что они имеют весьма специфический временной и топографический паттерн экспрессии. В первую очередь начинает экспрессироваться изоформа APP₆₉₅ в клетках, активно участвующих в морфогенетических событиях, в частности, в мезодермальных клетках, дающих начало нервной трубке [86]. Самая длинная изоформа APP₇₇₀ появляется позже и ограничена мезодермальными и эндодермальными

производными. Еще позже наблюдается экспрессия APP₇₅₁, которая встречается в различных участках развивающегося мозга, но с преобладанием в нервной трубке [86]. В постнатальном онтогенезе экспрессия APP на уровне белка в ткани мозга постепенно увеличивается с P3 до P10, снижаясь затем к P30 и сохраняясь на этом уровне до P400. При этом мРНК APP₆₉₅ максимально экспрессируется в структурах мозга, содержащих дифференцированные нервные клетки [65]. Повышение уровня APP в период активного синаптогенеза свидетельствует о функциональной роли APP в процессах роста нейритов и поддержании функциональной целостности синапсов в зрелом мозге. Более того, AICD, образующийся только из этой изоформы при ее амилоидогенном процессинге, является транскрипционно активным [87]. Также важно отметить, что повышенное содержание более длинных изоформ APP, включающих KPI-домен, наблюдается в обонятельных луковицах, где имеет место интенсивный синаптогенез в ходе всего постнатального периода, что подтверждает их роль в установлении новых синаптических контактов [88].

ВЛИЯНИЕ ГИПОКСИИ НА МЕТАБОЛИЗМ APP

Метаболизм APP при гипоксии изменяется довольно существенным образом, как на уровне его мРНК, так и белкового продукта. Это подтверждено исследованиями на уровне культур нервных клеток, и на целом мозге экспериментальных животных [89, 90]. При этом большинство исследований свидетельствует о повышении экспрессии APP на уровне мРНК и APP, а также снижении его расщепления α -секретазой [91]. Последнее коррелирует с изменением паттерна экспрессии металлопротеазы ADAM15 и существенным снижением содержания мРНК ADAM17, расщепляющей APP по α -секретазному пути [92]. На модели ишемии также показано, что нарушение снабжения тканей мозга кислородом ведет к повышению уровней мРНК APP, а также амилоидогенной β -секретазы в коре головного мозга крыс [93]. Гипоксия также приводит к активации γ -секретазного комплекса в клетках и тканях мозга [45]. В активация BACE-1 и γ -секретазы при гипоксии принимает участие гипоксия-индуцибельный фактор HIF-1 α [95]. Все эти изменения неизбежно ведут к накоплению в ткани мозга амилоидного A β пептида, развитию нейродегенеративных процессов и патогенезу БА [96]. В связи с важной ролью APP в формировании клеточных контактов и синаптических связей, а также регуляции важных нейрональных генов, изменение содержания и процессинга APP, вызванное гипоксией, имеет весьма серьезные последствия для развивающегося мозга. Тем не менее, данные по исследованию влияния **пренатальной ги-**

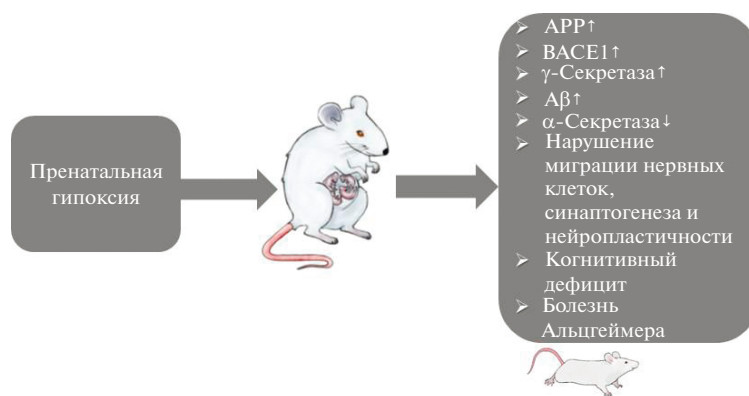


Рис. 3. Схематическое обобщение эффектов пренатальной гипоксии на метаболизм APP и его последствия для развивающегося организма.

поксии, которая является одним из наиболее часто встречающихся осложнений беременности, на метаболизм APP довольно единичны и не всегда когерентны (рис. 3).

Согласно нашим данным, однократная пренатальная гипоксия (E13.5–14, 3 ч, 7% O₂), приводит к повышению уровня APP в мозге потомства, а также снижению содержания его растворимых эктодоменов [97, 98]. Это коррелирует с нарушением миграции нервных клеток в эмбриональный период [99], замедлением развития моторных и когнитивных функций, снижением пластичности нервной системы и развитием когнитивного дефицита у животных, перенесших пренатальную гипоксию [100]. У таких животных также наблюдается нарушение архитектоники нервной ткани в обонятельном анализаторе и снижение обонятельной функции [101]. С другой стороны, другая группа авторов показала, что более мягкая повторяющаяся гипоксия в течение нескольких дней (E15–E21, 4 ч, 10% O₂) не приводила к изменению содержания APP в ткани мозга потомства и у таких животных наблюдался менее выраженный когнитивный дефицит [102]. Объяснением этому явлению может быть тот факт, что мягкая повторяющаяся гипоксия обладает эффектом преколонизации и повышает толерантность мозга к повторному действию гипоксии, что может препятствовать повышению уровня экспрессии APP и снижению активности α-секретазы потомства в результате действия повторяющейся материнской гипоксии [92, 98]. У новорожденных детей, перенесших перинатальную гипоксию и погибших в течение первых трех суток после рождения, также имеет место существенное повышение содержания APP особенно в тех участках мозга, в которых отмечались гистологические повреждения [103].

Интересные данные по анализу APP в гиппокампе мозга эмбрионов мышей через 2 часа после мягкой гипоксии матери на E17 (2 ч, 9% O₂) сви-

детельствуют о снижении содержания белкового продукта APP и BACE-1, при неизменном уровне мРНК APP [104], что может быть следствием как довольно мягкого действия гипоксии, так и относительно короткого промежутка времени между ее окончанием и взятием ткани для биохимического анализа, недостаточного для изменения экспрессии гена APP в ткани мозга эмбриона. Более того, авторы также обнаружили снижение содержания белков риелин и Disabled 1, в комплексе с которыми APP регулирует миграцию нервных клеток. Дефицит этих трех белков в период активной миграции нейронов в эмбриональном мозге будет, несомненно, приводить к нарушению их встраивания в формирующийся гиппокамп и нарушению его нормальной созревания и функционирования, что нередко наблюдается у потомства, перенесшего пренатальную гипоксию [105].

Сравнительный анализ влияния хронической гипобарической пренатальной гипоксии (E7–E20, 6 ч, 11.1% O₂) на содержание APP в коре и гиппокампе трансгенных мышей линии APPSwe/PS1A246E и мышей дикого типа выявил повышение его белкового продукта после гипоксии в обеих исследованных линиях, при этом у мышей, моделирующих патогенез БА, это сопровождалось существенным повышением образования амилоидного пептида и усилением когнитивного дефицита [106]. Более того, было выявлено, что пренатальная гипоксия приводит к повышению экспрессии β- и γ-секретаз, как у мышей дикого типа, так и у трансгенных животных вследствие деметилирования генов, кодирующих их последовательности, вызванного снижением экспрессии ДНК-метилтрансферазы 3b (DNMT3b) [107]. Это объясняет повышение продукции Aβ у трансгенных мышей после пренатальной гипоксии. Повышение экспрессии β-секретазы, HIF-1α и когнитивный дефицит были также обнаружены у крыс, перенесших пренатальную гипоксию (E20,

3 ч, 7% O₂) в возрасте одного месяца [108]. Повышение активности γ -секретазы, вызванное гипоксией, также приводит к усилению образования С-концевого фрагмента NICD, регулирующего экспрессию многих генов в период развития [33, 109].

Как было показано нами в многочисленных исследованиях, пренатальная гипоксия приводит к снижению экспрессии нейрпептидазы НЕП в коре и гиппокампе крыс, особенно выраженному в первые три месяца постнатального онтогенеза, что коррелирует со снижением уровня связывания С-концевого фрагмента APP AICD с промотером гена НЕП [110, 111]. Эти изменения обусловлены как повышением уровня каспаз, которые расщепляют AICD [28, 112], так и повышением уровня деацетилаз гистонов HDAC1, которые предотвращают связывание AICD с промотером гена НЕП [113, 114]. У трансгенных мышей, экспрессирующих APP(Swe)/PS1(A246E) человека, повышение экспрессии HDAC1 сохранялось в ткани мозга после хронической пренатальной гипоксии (E7–E20, 2 ч в день, 11.1% O₂) вплоть до 9 мес., в то время как у мышей дикого типа оно сохранялось в течение 3 мес. [114]. Снижение экспрессии основного амилоид-деградирующего фермента НЕП вследствие пренатальной гипоксии на фоне повышенной экспрессии APP и секретаз, расщепляющих его по амилоидогенному пути, а также снижение неамилоидогенной α -секретазы будет приводить к повышенной продукции и накоплению A β , что особенно ярко проявляется при использовании трансгенных животных, экспрессирующих APP и пресинилины человека, в частности линии 5xFAD [115]. Использование таких животных особенно важно для изучения патогенного влияния гипоксии на метаболизм амилоидного пептида, поскольку у грызунов эндогенный A β , из-за отличия его аминокислотной последовательности от такового человека, не обладает способностью агрегировать и образовывать токсичные комплексы [116], хотя основные биохимические изменения системы экспрессии, синтеза и катаболизма APP и A β при гипоксии имеют универсальный характер.

Важно отметить, что обнаруженные изменения экспрессии ДНК-метилтрансфераз и деацетилаз гистонов в ткани мозга животных, перенесших пренатальную гипоксию, свидетельствуют о том, что она приводит к серьезным изменениям на генетическом уровне, которые, несомненно, будут влиять на характер экспрессии нейрональных генов в ходе всего постнатального развития животных и приводить к нарушению формирования мозга и развитию нейродегенеративных заболеваний, включая БА [117].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований действия пренатальной гипоксии на метаболизм APP и состояние нервной системы экспериментальных животных в постнатальном онтогенезе поддерживают гипотезу о том, что перенесенные в пренатальном и раннем постнатальном периодах заболевания и стрессы изменяют программу генетического развития и запускают каскады реакций, в том числе на генетическом уровне, предрасполагающие к развитию спорадической формы БА [118]. Данные литературы убедительно свидетельствуют о том, что гипоксия, а также ишемия мозга ведут к сдвигу процессов амилоидного метаболизма в сторону накопления амилоидного пептида, и в связи с этим любые нарушения снабжения мозга кислородом являются факторами риска развития БА. В настоящее время ведется активный поиск средств профилактики патогенного действия гипоксии, в том числе в пренатальный период, а также его компенсации [110, 111, 117]. Одним из таких подходов является гипоксическое прекодиционирование, которое, как показывают наши исследования, способно предотвращать изменение уровня экспрессии APP, ферментов, катаболизирующих APP по неамилоидогенному пути, а также амилоид-деградирующих ферментов [92, 98]. Дальнейшие исследования как нормальной физиологии и функций APP и A β , так и молекулярных механизмов патогенеза БА, в частности, эффектов пренатальных стрессоров, поможет расширить сложившиеся на сегодняшний день представления о причинах возникновения этого и других нейродегенеративных заболеваний, и разработать персонализированную систему их профилактики и лечения.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания 075-00408-21-00.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Nalivaeva N.N., Turner A.J.* // FEBS Lett. 2013. V. 587. P. 2046–2054.
2. *Cho Y., Bae H.-G., Okun E., Arumugam T.V., Jo D.-G.* // Pharmacol. Ther. 2022. V. 235. P. 108122.
3. *Goate A., Hardy J.* // J. Neurochem. 2012. V. 120. Suppl. 1. P. 3–8.
4. *Ludewig S., Korte M.* // Front. Mol. Neurosci. 2017. V. 9. P. 161.
5. *Sandbrink R., Banati R., Masters C.L., Beyreuther K., König G.* // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1993. V. 695. P. 183–189.

6. Habekost M., Qvist P., Denham M., Holm I.E., Jørgensen A.L. // *Mol. Neurobiol.* 2021. V. 58. P. 2075–2087.
7. Chua L.M., Lim M.L., Wong B.S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V. 437. P. 642–647.
8. Tanaka S., Shiojiri S., Takahashi Y., Kitaguchi N., Ito H., Kameyama M., Kimura J., Nakamura S., Ueda K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989. V. 165. P. 1406–1414.
9. Preece P., Virley D.J., Costandi M., Coombes R., Moss S.J., Mudge A.W., Jazin E., Cairns N.J. // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2004. V. 122. P. 1–9.
10. Johnson S.A., McNeill T., Cordell B., Finch C.E. // *Science.* 1990. V. 248. P. 854–857.
11. Copenhaver P.F., Kögel D. // *Front. Mol. Neurosci.* 2017. V. 10. P. 3.
12. Barrett P.J., Song Y., Van Horn W.D., Hustedt E.J., Schafer J.M., Hadzselimovic A., Beel A.J., Sanders C.R. // *Science.* 2012. V. 336. P. 1168–1171.
13. Song X.-J., Zhou H.-Y., Sun Y.-Y., Huang H.-C. // *J. Alzheimers Dis.* 2021. V. 84. P. 937–957.
14. Eggert S., Paliga K., Soba P., Evin G., Masters C.L., Weidemann A., Beyreuther K. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 18146–18156.
15. Small D.H., Nurcombe V., Reed G., Clarris H., Moir R., Beyreuther K., Masters C.L. // *J. Neurosci.* 1994. V. 14. P. 2117–2127.
16. August A., Schmidt N., Klingler J., Baumkötter F., Lechner M., Klement J., Eggert S., Vargas C., Wild K., Keller S., Kins S. // *J. Neurochem.* 2019. V. 151. P. 626–641.
17. Wang X., Zhou X., Li G., Zhang Y., Wu Y., Song W. // *Front. Mol. Neurosci.* 2017. V. 10. P. 294.
18. Guénette S., Strecker P., Kins S. // *Front. Mol. Neurosci.* 2017. V. 10. P. 87.
19. Walter J., Haass C. // *Methods Mol. Med.* 2000. V. 32. P. 149–168.
20. Haass C., Kaether C., Thinakaran G., Sisodia S. // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2012. V. 2. P. a006270.
21. Nowakowska-Gołacka J., Czapiewska J., Sominka H., Sowa-Rogozińska N., Słomińska-Wojewódzka M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 117.
22. Tsatsanis A., Dickens S., Kwok J.C.F., Wong B.X., Duce J.A. // *Neurochem. Res.* 2019. V. 44. P. 1367–1374.
23. Lichtenthaler S.F., Tschirner S.K., Steiner H. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2022. V. 72. P. 101–110.
24. Chasseigneaux S., Allinquant B. // *J. Neurochem.* 2012. V. 120. Suppl. 1. P. 99–108.
25. Coronel R., Bernabeu-Zornoza A., Palmer C., Muñoz-Moreno M., Zambrano A., Cano E., Liste I. // *Mol. Neurobiol.* 2018. V. 55. P. 7107–7117.
26. Beckett C., Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Turner A.J. // *Cell. Signal.* 2012. V. 24. P. 402–409.
27. Cha H.J., Shen J., Kang J. // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. P. 66.
28. Kerridge C., Kozlova D.I., Nalivaeva N.N., Turner A.J. // *Front. Neurosci.* 2015. V. 9. P. 426.
29. Buoso E., Biundo F., Lanni C., Schettini G., Govoni S., Racchi M. // *J. Alzheimers Dis.* 2012. V. 30. P. 393–405.
30. Willem M., Tahirovic S., Busche M., Ovsepien S.V., Chafai M., Kootar S., Hornburg D., Evans L.D., Moore S., Daria A., Hampel H., Müller V., Giudici C., Nuscher B., Wenninger-Weinzierl A., Kremmer E., Heneka M.T., Thal D.R., Giedraitis V., Lannfelt L., Müller U., Livesey F.J., Meissner F., Herms J., Konnerth A., Marie H., Haass C. // *Nature.* 2015. V. 526. P. 443–447.
31. Zhang Z., Tian Y., Ye K. // *Transl. Neurodegener.* 2020. V. 9. P. 1.
<https://doi.org/10.1186/s40035-019-0179-3>
32. Weidemann A., Eggert S., Reinhard F.B., Vogel M., Paliga K., Baier G., Masters C.L., Beyreuther K., Evin G. // *Biochemistry.* 2002. V. 41. P. 2825–2835.
33. Shen W., Huang J., Wang Y. // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 652273.
34. Lefranc-Jullien S., Sunyach C., Checler F. // *J. Neurochem.* 2006. V. 97. P. 807–817.
35. Hooper N.M., Turner A.J. // *Curr. Med. Chem.* 2002. V. 9. P. 1107–1119.
36. Maloney B., Ge Y.W., Greig N., Lahiri D.K. // *FASEB J.* 2004. V. 18. P. 1288–1290.
37. Lichtenthaler S.F., Tschirner S.K., Steiner H. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2022. V. 72. P. 101–110.
38. Parvathy S., Hussain I., Karran E.H., Turner A.J., Hooper N.M. // *Biochemistry.* 1999. V. 38. P. 9728–9734.
39. Corbett N.J., Hooper N.M. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018. V. 1112. P. 177–183.
40. Vassar R.J. // *Mol. Neurosci.* 2004. V. 23. P. 105–114.
41. Checler F., Afram E., Pardossi-Piquard R., Lauritzen I. // *J. Biol. Chem.* 2021. V. 296. P. 100489.
42. Lathia J.D., Mattson M.P., Cheng A.J. // *Neurochem.* 2008. V. 107. P. 1471–1481.
43. Papadopoulou A.A., Fluhrer R. // *Front. Cardiovasc. Med.* 2020. V. 7. P. 591787.
44. Gunyuzlu P.L., White W.H., Davis G.L., Hollis G.F., Toyn J.H. // *Mol. Biotechnol.* 2000. V. 15. P. 29–37.
45. Park G., Nhan H.S., Tyan S.H., Kawakatsu Y., Zhang C., Navarro M., Koo E.H. // *Cell Rep.* 2020. V. 31. P. 107839.
46. Taru H., Yoshikawa K., Suzuki T. // *FEBS Lett.* 2004. V. 567. P. 248–252.
47. Belyaev N.D., Nalivaeva N.N., Makova N.Z., Turner A.J. // *EMBO J.* 2009. V. 10. P. 94–100.
48. Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A., Salbaum J.M., Masters C.L., Grzeschik K.H., Multhaup G., Beyreuther K., Müller-Hill B. // *Nature.* 1987. V. 325. P. 733–736.
49. Hardy J. // *FEBS J.* 2017. V. 284. P. 1040–1044.
50. Sambamurti K., Greig N.H., Lahiri D.K. // *Neuromolecular Med.* 2002. V. 1. P. 1–31.
51. Wang R., Lahiri D.K. // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. P. 3074.
52. Lahiri D.K. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004. V. 1030. P. 282–288.
53. Schonrock N., Matamales M., Ittner L.M., Götz J. // *Exp. Neurol.* 2012. V. 235. P. 447–454.
54. Lau P., Bossers K., Janky R., Salta E., Frigerio C.S., Barbash S., Rothman R., Sierksma A.S., Thathiah A.,

- Greenberg D., Papadopoulou A.S., Achsel T., Ayoubi T., Soreq H., Verhaagen J., Swaab D.F., Aerts S., De Strooper B.* // *EMBO Mol. Med.* 2013. V. 5. P. 1613–1634.
55. *Hébert S.S., Horré K., Nicolai L., Papadopoulou A.S., Mandemakers W., Silahtaroglu A.N., Kauppinen S., Delacourte A., De Strooper B.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008. V. 105. P. 6415–6420.
56. *Coulson E.J., Paliga K., Beyreuther K., Masters C.L.* // *Neurochem. Int.* 2000. V. 36. P. 175–184.
57. *Soba P., Eggert S., Wagner K., Zentgraf H., Siehl K., Kreger S., Löwer A., Langer A., Merdes G., Paro R., Masters C.L., Müller U., Kins S., Beyreuther K.* // *EMBO J.* 2005. V. 24. P. 3624–3634.
58. *Heber S., Herms J., Gajic V., Hainfellner J., Aguzzi A., Rüllicke T., von Kretschmar H., von Koch C., Sisodia S., Tremml P., Lipp H.P., Wolfner D.P., Müller U.* // *J. Neurosci.* 2000. V. 20. P. 7951–7963.
59. *Ring S., Weyer S.W., Kilian S.B., Waldron E., Pietrzik C.U., Filippov M.A., Herms J., Buchholz C., Eckman C.B., Korte M., Wolfner D.P., Müller U.C.* // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. P. 7817–7826.
60. *Sawa M., Overk C., Becker A., Derse D., Albay R., Weldy K., Salehi A., Beach T.G., Doran E., Head E., Yu Y.E., Mobley W.C.* // *Alzheimers Dement.* 2021. P. 1–32.
61. *Young-Pearse T.L., Bai J., Chang R., Zheng J.B., Lo-Turco J.J., Selkoe D.J.* // *J. Neurosci.* V. 27. P. 14459–14469.
62. *Young-Pearse T.L., Suth S., Luth E.S., Sawa A., Selkoe D.J.* // *J. Neurosci.* V. 30. P. 10431–10440.
63. *Rice H.C., Townsend M., Bai J., Suth S., Cavanaugh W., Selkoe D.J., Young-Pearse T.L.* // *Development.* 2012. V. 139. P. 3986–3996.
64. *Joo Y., Ha S., Hong B.H., Kim Ja., Chang K.A., Liew H., Kim S., Sun W., Kim J.H., Chong Y.H., Suh Y.H., Kim H.S.* // *PLoS One.* 2010. V. 5. P. e14203.
65. *Kirazov E., Kirazov L., Bigl V., Schliebs R.* // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2001. V. 19. P. 287–296.
66. *Plummer S., Van den Heuvel C., Thornton E., Corrigan F., Cappai R.* // *Aging Dis.* 2016. V. 7. P. 163–179.
67. *Kohli B.M., Pflieger D., Mueller L.N., Carbonetti G., Aebersold R., Nitsch R.M., Konietzko U.* // *J. Proteome Res.* 2012. V. 11. P. 4075–4090.
68. *Pohlkamp T., Wasser C.R., Herz J.* // *Front. Mol. Neurosci.* 2017. V. 10. P. 54.
69. *Akaaboune M., Allinquant B., Farza H., Roy K., Magoul R., Fiszman M., Festoff B.W., Hantai D.* // *Mol. Cell. Neurosci.* 2000. V. 15. P. 355–367.
70. *Choi H.Y., Liu Y., Tennert C., Sugiura Y., Karakatsani A., Kröger S., Johnson E.B., Hammer R.E., Lin W., Herz J. Elife.* 2013. V. 2. P. e00220.
71. *Octave J.N., Pierrot N., Ferao Santos S., Nalivaeva N.N., Turner A.J.J.* // *Neurochem.* 2013. V. 126. P. 183–190.
72. *Santos S.F., Pierrot N., Morel N., Gailly P., Sindic C., Octave J.N.* // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. P. 4708–4718.
73. *Weyer S.W., Klevanski M., Delekate A., Voikar V., Aydin D., Hick M., Filippov M., Drost N., Schaller K.L., Saar M., Vogt M.A., Gass P., Samanta A., Jäschke A., Korte M., Wolfner D.P., Caldwell J.H., Müller U.C.* // *EMBO J.* V. 30. P. 2266–2280.
74. *Lee S.H., Kang J., Ho A., Watanabe H., Bolshakov V.Y., Shen J.* // *Neuron.* 2020. V. 108. P. 676–690. e8.
75. *Duce J.A., Tsatsanis A., Cater M.A., James S.A., Robb E., Wikke K., Leong S.L., Perez K., Johanssen T., Greenough M.A., Cho H.H., Galatis D., Moir R.D., Masters C.L., McLean C., Tanzi R.E., Cappai R., Barnham K.J., Ciccotosto G.D., Rogers J.T., Bush A.I.* // *Cell.* 2010. V. 142. P. 857–867.
76. *Rogers J.T., Randall J.D., Cahill C.M., Eder P.S., Huang X., Gunshin H., Leiter L., McPhee J., Sarang S.S., Utsuki T., Greig N.H., Lahiri D.K., Tanzi R.E., Bush A.I., Giordano T., Gullans S.R.* // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 45518–45528.
77. *August A., Schmidt N., Klingler J., Baumkötter F., Lechner M., Klement J., Eggert S., Vargas C., Wild K., Keller S., Kins S.* // *J. Neurochem.* 2019. V. 151. P. 626–641.
78. *Ramaker J.M., Copenhaver P.F.* // *Neurogenesis (Austin).* 2017. V. 4. P. e1288510.
79. *Ramaker J.M., Swanson T.L., Copenhaver P.F.* // *J. Neurosci.* 2013. V. 33. P. 10165–10181.
80. *Devi L., Anandatheerthavarada H.K.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2010. V. 1802. P. 11–19.
81. *Pajak B., Kania E., Orzechowski A.* // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. V. 2016. P. 1805304.
82. *Kerridge C., Belyaev N.D., Nalivaeva N.N., Turner A.J.* // *J. Neurochem.* 2014. V. 130. P. 419–431.
83. *Hicks D.A., Makova N.Z., Gough M., Parkin E.T., Nalivaeva N.N., Turner A.J.* // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 26039–26051.
84. *Nalivaeva N.N., Turner A.J.* // *Chem. Biol. Interact.* 2016. V. 259. P. 301–306.
85. *Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Turner A.J.* // *Neurochem. Res.* 2016. V. 41. P. 620–630.
86. *Sarasa M., Sorribas V., Terradoa J., Climent S., Palacios J.M., Mengod G.* // *Mech. Dev.* 2000. V. 94. P. 233–236.
87. *Belyaev N.D., Kellett K.A., Beckett C., Makova N.Z., Revett T.J., Nalivaeva N.N., Hooper N.M., Turner A.J.* // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 41443–41454.
88. *Löffler J., Huber G.J.* // *Neurochem.* 1992. V. 59. P. 1316–1324.
89. *Fisk L., Nalivaeva N.N., Boyle J.P., Peers C.S., Turner A.J.* // *Neurochem. Res.* 2007. V. 32. P. 1741–1748.
90. *von Arnim C.A.F., Hellweg R., Büchner M., Huber R., Riepe M.W.* // *J. Neural. Transm. (Vienna).* 2005. V. 112. P. 491–498.
91. *Webster N.J., Green K.N., Settle V.J., Peers C., Vaughan P.F.T.* // *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2004. V. 130. P. 161–169.
92. *Rybnikova E., Gluschenko T., Galeeva A., Tulkova E., Nalivaeva N.N., Makova N.Z., Turner A.J., Samoilov M.* // *Neurosci. Res.* 2012. V. 72. P. 364–373.
93. *Babusikova E., Dobrota D., Turner A.J., Nalivaeva N.N.* // *Biochemistry (Mosc).* 2021. V. 86. P. 680–692.
94. *Salminen A., Kauppinen A., Kaarniranta K.* // *J. Neurochem.* 2017. V. 140. P. 536–549.
95. *Gertsik N., Chiu D., Li Y.M.* // *Front. Aging Neurosci.* 2015. V. 6. P. 342.
96. *Shiota S., Takekawa H., Matsumoto S.E., Takeda K., Nurwidya F., Yoshioka Y., Takahashi F., Hattori N.,*

- Tabira T., Mochizuki H., Takahashi K. // *J. Alzheimers Dis.* 2013. V. 37. P. 325–333.
97. Nalivaeva N.N., Fisk L., Canet Aviles R.M., Plesneva S.A., Zhuravin I.A., Turner A.J. // *Lett. Peptide Sci.* 2003. V. 10. P. 455–462.
98. Nalivaeva N.N., Fisk L., Kochkina E.G., Plesneva S.A., Zhuravin I.A., Babusikova E., Dobrota D., Turner A.J. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004. V. 1035. P. 21–33.
99. Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Tumanova N.L., Zhuravin I.A. // *Front. Neurosci.* 2016. V. 10. P. 126.
100. Zhuravin I.A., Dubrovskaya N.M., Vasilev D.S., Postnikova T.Y., Zaitsev A.V. // *Neurobiol. Learn. Mem.* 2019. V. 164. P. 107066.
101. Tumanova N.L., Vasilev D.S., Dubrovskaya N.M., Nalivaeva N.N., Zhuravin I.A. // *Cell Tiss. Biol.* V. 15. P. 482–492.
102. Mao M., Yang L., Jin Z., Li L.X., Wang Y.R., Li T.T., Zhao Y.J., Ai J. // *Acta Pharmacol. Sin.* 2021. V. 42. P. 361–369.
103. Baiden-Amissah K., Joashi U., Blumberg R., Mehmet H., Edwards A.D., Cox P.M. // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1998. V. 24. P. 346–352.
104. Golan M.H., Mane R., Molczadzki G., Zuckerman M., Kaplan-Louison V., Huleihel M., Perez-Polo J.R. // *Neuropharmacology.* 2009. V. 57. P. 511–522.
105. Vetrovoy O., Stratilov V., Nimiritsky P., Makarevich P., Tyulkova E. // *Neurochem. Res.* 2021. V. 46. P. 550–563.
106. Zhang X., Li L., Zhang X., Xie W., Li L., Yang D., Heng X., Du Y., Doody R.S. Le W. // *Neurobiol. Aging.* 2013. V. 34. P. 663–678.
107. Liu H., Qiu H., Yang J., Ni J., Le W. // *Alzheimers Dement.* 2016. V. 12. P. 130–143.
108. Ghotbeddin Z., Tabandeh M.R., Pourmahdi Borujeni M., Fahimi Truski F., Zalaki Ghorbani Pour M.R., Tabrizian L. // *Brain Behav.* 2021. V. 11. P. e02078.
109. Wang R., Zhang Y.W., Zhang X., Liu R., Zhang X., Hong S., Xia K., Xia J., Zhang Z., Xu H. // *FASEB J.* 2006. V. 20. P. 1275–1277.
110. Zhuravin I.A., Dubrovskaya N.M., Vasilev D.S., Kozlova D.I., Kochkina E.G., Tumanova N.L., Nalivaeva N.N. // *Neurochem. Res.* 2019. V. 44. P. 1387–1398.
111. Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Lewis D.I., Pickles A.R., Makova N.Z., Bagrova D.I., Dubrovskaya N.M., Plesneva S.A., Zhuravin I.A., Turner A.J. // *J. Mol. Neurosci.* 2012. V. 46. P. 569–77.
112. Kozlova D.I., Vasylev D.S., Dubrovskaya N.M., Nalivaeva N.N., Tumanova N.L., Zhuravin I.A. // *Zh. Evol. Biokhim. Fiziol.* 2015. V. 51. P. 427–430. [Article in Russian]
113. Belyaev N.D., Nalivaeva N.N., Makova N.Z., Turner A.J. // *EMBO Rep.* 2009. V. 10. P. 94–100.
114. Wang Z., Zhang X.J., Li T., Li J., Tang Y., Le W. // *CNS Neurosci. Ther.* 2014. V. 20. P. 209–217.
115. Shen G., Hu S., Zhao Z., Zhang L., Ma Q. // *Front Aging Neurosci.* 2020. V. 12. P. 251.
116. Fraser P.E., Nguyen J.T., Inouye H., Surewicz W.K., Selkoe D.J., Podlisny M.B., Kirschner D.A. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. P. 10716–10723.
117. Nalivaeva N.N., Turner A.J., Zhuravin I.A. // *Front. Neurosci.* 2018. V. 19. P. 825.
118. Lahiri D.K., Zawia N.H., Greig N.H., Sambamurti K., Maloney B. // *Biogerontology.* 2008. V. 9. P. 375–379.

Effect of Prenatal Hypoxia on Amyloid Precursor Protein Metabolism

N. N. Nalivaeva^{a, b}

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, RAS, St. Petersburg, Russia*

^b *Pavlov Institute of Physiology, RAS, St. Petersburg, Russia*

The constitutive transmembrane amyloid precursor protein (APP) is not only one of the determining factors in the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) but also an important regulatory protein that determines the development of the nervous system and its normal functioning, starting from the earliest stages of embryogenesis. The products of proteolytic cleavage of APP, including its N-terminal fragments, amyloid peptide A β , as well as the intracellular domain AICD, have a number of important properties that determine the migration of nerve cells, synaptogenesis, plasticity of nervous tissue, functioning of ion channels and intracellular signalling, as well as the expression of neuronal genes. The character of APP expression and its metabolism in the embryonic period and the effect on these processes of various adverse factors including hypoxia determine not only the dynamics of brain development but also the nature of its functioning during the entire postnatal life of the individuals. The objective of this review is critical analysis of accumulated data on the effect of prenatal hypoxia on the level of APP expression and its metabolism in nervous tissue, as well as on the development of AD pathogenesis.

Keywords: amyloid precursor protein, Alzheimer's disease, hypoxia, nervous system, neurodegeneration, ontogenesis, prenatal hypoxia, proteolysis, development

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 616.8-00

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОЙ КОРРЕКЦИИ НАРУШЕНИЙ
ГЛЮКОКОРТИКОИДНОЙ СИСТЕМЫ ГИППОКАМПА КРЫС,
ВЫЗВАННЫХ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПОКСИЕЙ

© 2022 г. О. В. Ветровой^{1, 2, *}, В. А. Стратилова¹, Е. В. Ломерт³, Е. И. Тюлькова¹

¹ Лаборатория регуляции функций нейронов мозга,

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

² Кафедра биохимии, ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Группа молекулярной генетики опухолевых клеток, ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 21.01.2022 г.

После доработки 17.02.2022 г.

Принята к публикации 26.02.2022 г.

В настоящем исследовании было проведено изучение влияния нейропротективного метода трехкратной умеренной гипобарической гипоксии, предъявляемой на 8–10 сут постнатального развития, на содержание серотониновых рецепторов 7-го типа (5HT7R), уровень мРНК глюкокортикоидных рецепторов (*nr3c1*), глюкокортикоид-зависимых генов рецептора кортиколиберина 1го типа (*crhr1*) и $\alpha 7$ субъединицы рецептора ацетилхолина (*chnra7*) в гиппокампе 2-недельных контрольных крысят и крысят, перенесших пренатальную гипоксию (ПГ). ПГ вызывает увеличение содержания белка 5HT7R, а также ведет к уменьшению количества мРНК как глюкокортикоидных рецепторов (*nr3c1*), так и мишеней глюкокортикоид-зависимой транскрипции (*crhr1*, *chnra7*) в гиппокампе. Сеансы 3 УГГ вызывают снижение экспрессии 5HT7R на уровне белка в гиппокампе ПГ крысят до контрольного уровня, не влияя на этот показатель у контрольных животных. 3 УГГ не оказывает влияние на содержание мРНК *nr3c1*, *crhr1* и *chnra7* в гиппокампе контрольных и ПГ крысят. Результаты свидетельствуют о том, что стимуляция мозга крыс в раннем неонатальном периоде сеансами умеренной гипоксии не является достаточно эффективным методом предотвращения в раннем онтогенезе нарушений глюкокортикоидной системы гиппокампа, вызванных пренатальной гипоксией, однако позволяют предположить отсроченные корректирующие эффекты данного метода.

Ключевые слова: пренатальная гипоксия, умеренная гипобарическая гипоксия, гиппокамп, 5HT7R, глюкокортикоидные рецепторы, глюкокортикоид-зависимая транскрипция

DOI: 10.31857/S1027813322030128

ВВЕДЕНИЕ

Ранний онтогенез – период пренатального и раннего постнатального развития, является наиболее значимым этапом для настройки функций клеток мозга [1, 2]. В отличие от зрелого организма, повреждающее действие на который приводит к нарушению функционирования уже сформировавшейся структуры, патологические воздействия в пренатальном периоде вызывают изменения настройки порогов чувствительности сигнальных систем развивающегося организма, которые сохраняются на протяжении дальнейшей жизни [3–5]. Проявляясь в младенчестве в нарушении физического, эмоционального и умственного развития ребенка, последствия пренатального стресса сохраняются у взрослых часто в латентной форме, усугубляясь с возрастом [6–9].

Особенно опасным стрессовым фактором в раннем онтогенезе является гипоксия [7, 10]. Ра-

нее нами было показано, что гипоксические эпизоды, предъявляемые беременным самкам крыс на 14–16 сут гестации, в период формирования гиппокампа плода, вызывают устойчивые нарушения функционирования глюкокортикоидной системы потомства [10], выражающиеся в нарушении экспрессии глюкокортикоидных рецепторов в гиппокампе, снижении глюкокортикоид-зависимой транскрипции [4], ослаблении экстрагипоталамического контроля над глюкокортикоидной отрицательной обратной связью и, как следствие, увеличении базального уровня кортикостерона [10]. Данные особенности проявляются на протяжении всей жизни и ведут к ослаблению периферической рецепции глюкокортикоидов и, следовательно, нарушению реализации глюкокортикоид-зависимых функций, сопровождающаяся дисфункцией медиаторных систем мозга.

Известно, что стимуляция клеток гиппокампа серотонином, вырабатываемым проекциями дорсальных ядер шва [11], вовлекается в обеспечение стабильной экспрессии глюкокортикоидных ре-

* Адресат для корреспонденции: 199034 Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6; e-mail: vov210292@yandex.ru.

цепторов [12]. Было показано, что эффективность выброса серотонина может быть увеличена сеансами краткосрочной гипоксии за счет деполяризации клеточных мембран [13]. В рамках исследований, направленных на изучение эффектов нейротропных методов пре- и посткондиционирования было выявлено, что сеансы умеренной гипобарической гипоксии способствуют нормализации экспрессии глюкокортикоидных рецепторов у взрослых крыс, подвергавшихся гипоксии и тяжелому психоэмоциональному стрессу [14, 15]. Поэтому нами было сделано предположение о возможности использования трехкратной умеренной гипобарической гипоксии с целью перепрограммирования функциональной активности клеток гиппокампа крыс, переживших пренатальную гипоксию. Настоящее исследование было направлено на проверку этой гипотезы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные и модель пренатальной гипоксии. Работа выполнена на взрослых самках крыс линии Wistar весом 300–350 г и их потомстве. Животные были получены из Биоколлекции Института физиологии им. И.П. Павлова РАН и содержались в лабораторных условиях при свободном доступе к воде и пище. При проведении экспериментов соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы опытов были утверждены комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П. Павлова РАН.

Для создания ПГ беременных самок помещали трижды (на 14, 15 и 16 сут беременности) в барокамеру проточного типа и снижали давление до 180 мм рт. ст, что соответствует 5% нормобарического кислорода. Длительность каждого воздействия составляла 3 ч, интервал между воздействиями – 24 ч. Перед рождением потомства беременных крыс рассаживали по отдельным клеткам, и в дальнейшем каждый помет содержался отдельно.

Последующая работа производилась на детенышах самцах. Половину контрольных и ПГ крысят подвергали трем сеансам умеренной гипобарической гипоксии (3 УГГ). Для создания 3 УГГ на 8, 9 и 10 сут постнатального периода крысят помещали в барокамеру проточного типа и снижали давление до 360 мм рт. ст, что соответствует 10% нормобарического кислорода. Длительность каждого воздействия составляла 2 часа, интервал между воздействиями – 24 ч. После каждого воздействия крысят возвращали в материнскую клетку. С целью стандартизации условий контрольных и ПГ животных, не подвергавших сеансам 3 УГГ, также помещали в барокамеру по аналогичному протоколу, но не снижали давление.

Таким образом, эксперименты проведены на 4 группах крыс: 1) контроль; 2) ПГ; 3) контроль + 3 УГГ; 4) ПГ + 3 УГГ (для каждой группы $n = 5$).

Подготовка проб мозга для анализа. Гиппокамп 2-недельных крысят быстро извлекали и замораживали для дальнейшей экстракции и анализа белков интереса методом вестерн блоттинга либо помещали в тризол (BC032, ExtractRNA, Евроген, Россия) для экстракции РНК и последующего количественного анализа мРНК интереса.

Вестерн блоттинг. Для экстракции белков гиппокампа 2-недельных крысят гомогенизировали в ручном гомогенизаторе стекло–стекло в 50 мМ Трис-НСI буфере (рН 8.0), содержащем 150 мМ NaCl, 1% тритон X-100, коктейль ингибиторов протеаз и фосфатаз (78440, Thermo Scientific, США), инкубировали на качалке 30 мин при температуре +4°C, после чего центрифугировали 10 мин при 14000 g, отбирали супернатант и кипятили 5 мин с трехкратным буфером Лэммли.

Белки полученных тотальных лизатов гиппокампа разделяли методом электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли и осуществляли перенос на PVDF мембрану (Thermo Scientific, США). Далее, после блокировки в течение 1 часа в растворе 5% сухого молока на Трис-NaCl буфере (TBS, рН 7.4), мембраны инкубировали с моноклональными кроличьими антителами против 5HT7R (1 : 1000, ab128892, Abcam, США) и с поликлональными кроличьими антителами против β -актина (1 : 2000, a2066, Sigma Ald., США) в течение 2 ч при комнатной температуре. Мембраны отмывали в TBST буфере и инкубировали с козьими противокроличьими HRP-антителами (0.25 мкг/мл, a16096, Thermo Scientific, США) в течение 1 часа при комнатной температуре. После серии отмывок в буфере TBS, содержащем 0.1% Tween-20, осуществляли визуализацию белков интереса с применением хемилюминесцентного набора Clarity ECL (Bio-Rad, США) и используя систему документирования ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad, США). Количественный анализ содержания белка 5HT7R проводили с использованием программы ImageJ (NIH, Bethesda, MD, США) нормируя данные на содержание β -актина.

Выделение и очистка РНК, обратная транскрипция и количественная ПЦР в реальном времени. Общую РНК из гиппокампа 2-недельных крысят изолировали, используя набор ExtractRNA (BC032, Евроген, Россия), очищали от ДНК с применением наборов DNaseI (EN0521, ThermoFisher, США) и CleanRNA Standard (BC033, Евроген, Россия) согласно инструкциям производителя. Синтез кДНК проводили из 1 мкг тотальной РНК используя набор MMLV Reverse Transcription Kit (SK021, Евроген, Россия). Количественную ПЦР в реальном времени проводили, используя набор qPCRmix-HS SYBR + LowROX (Евроген, Россия) на амплификаторе Real-Time CFX96 (Bio-Rad, США). Последовательности праймеров, температуры плавления и размеры фрагментов представлены в табл. 1.

Уровни содержания мРНК глюкокортикоидного рецептора (*nr3c1*), глюкокортикоид-зависи-

Таблица 1. Праймеры, использованные для количественной ПЦР в реальном времени

Ген	Праймеры 5'–3'	Температура плавления T , °C	Размер продукта, п. н.
Бета-2-микроглобулин (<i>b2m</i>)	Forward TGCCATTTCAGAAAACCTCCCC Reverse GAGGAAGTTGGGCTTCCCATT	57	73
Глюкокортикоидный рецептор (<i>nr3c1</i>)	Forward ATCATACAGACAATCAAG Reverse TACTCTTCATAGGATACC	55	156
Рецептор кортиколиберина Iго типа (<i>crhr1</i>)	Forward CGTCTTCATCTACTTCAACTC Reverse GGACCTCACTGTTCAGAA	62	86
$\alpha 7$ -субъединица рецептора ацетилхолина (<i>chrna7</i>)	Forward CTCTTGGGAATAACTGTCTT Reverse CGAAGTATTGTGCTATCA	55	105

мых генов рецептора кортиколиберина Iго типа (*crhr1*) и $\alpha 7$ субъединицы рецептора ацетилхолина (*chrna7*), нормированные на содержание мРНК β -2 микроглобулина (*b2m*) в качестве референса, были исследованы с использованием $\Delta\Delta Ct$ метода.

Статистическая обработка результатов. Результаты обрабатывали с помощью пакетов анализа данных STATISTICA 7.0 Stat Soft, Inc и Microsoft Excel'2003, используя непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Изменения считали достоверными при $p \leq 0.05$. Все результаты представлены в виде среднего арифметического \pm SEM (standard error of mean).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки влияния сеансов 3 УГГ на количество серотониновых рецепторов 5HT7R в гиппокампе 2-недельных крысят, переживших ПГ, мы использовали метод вестерн блоттинг. ПГ вызывает увеличение количества 5HT7R по сравнению с контролем (185% от контроля) (рис. 1). Сеансы 3 УГГ не влияют на количество 5HT7R в гиппокампе контрольных крысят (113% от контроля), но вызывают снижение их количества у крысят, переживших ПГ (125% от контроля) (рис. 1).

Для оценки влияния сеансов 3 УГГ на уровень экспрессии гена глюкокортикоидных рецепторов (*nr3c1*) и эффективность глюкокортикоид-зависимой экспрессии генов (*crhr1*, *chrna7*) [16] в гиппокампе 2-недельных ПГ крысят был осуществлен количественный анализ мРНК этих генов. ПГ вызывает уменьшение количества *nr3c1* по сравнению с контролем (51% от контроля) (рис. 2а), что сопровождается уменьшением содержания мРНК глюкокортикоид-зависимых генов *crhr1* (рис. 2б) и *chrna7* (рис. 2в) (25% и 35% от контроля, соответственно). Сеансы 3 УГГ не влияют на уровень экспрессии *nr3c1* (рис. 2а) и глюкокортикоид-зависимую транскрипцию (рис. 2, б, в) ни у контрольных крысят, ни у крысят, подвергавшихся ПГ.

В настоящее время известным является факт того, что серотонинергическая стимуляция нейронов гиппокампа опосредованно через серотониновые рецепторы 5HT7R приводит к увеличе-

нию количества глюкокортикоидных рецепторов NR3C1 [12]. Ранее нами было показано, что патогномичным и опосредующим эндокринные эффекты пренатальной гипоксии симптомом является хроническое снижение количества NR3C1 и экспрессии генов, регулируемых данным транскрипционным фактором, в нейронах гиппокампа, сопровождающееся стабильным увеличением уровня кортикостерона в плазме крови [10]. Как

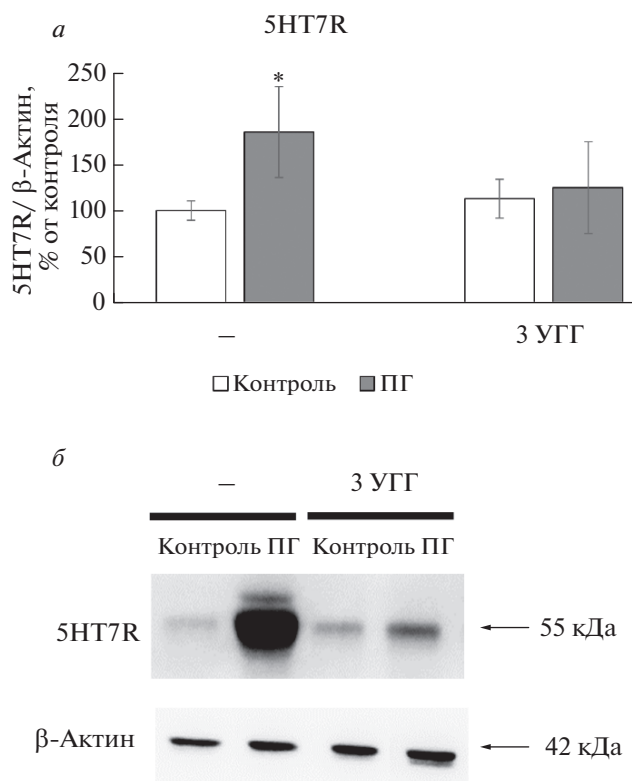


Рис. 1. Гистограмма (а) и фотография результатов анализа содержания белка 5HT7R методом вестерн блоттинга (б) в гиппокампе 2-недельных контрольных крысят и крысят, переживших ПГ на 14–16 сут эмбриогенеза, с последующими сеансами 3 УГГ на 8–10 сут постнатального развития либо без них. Данные нормированы на количество белка β -актина и представлены в % от контроля. * Различия с контролем статистически достоверны, $p \leq 0.05$ (U-критерий Манна–Уитни).

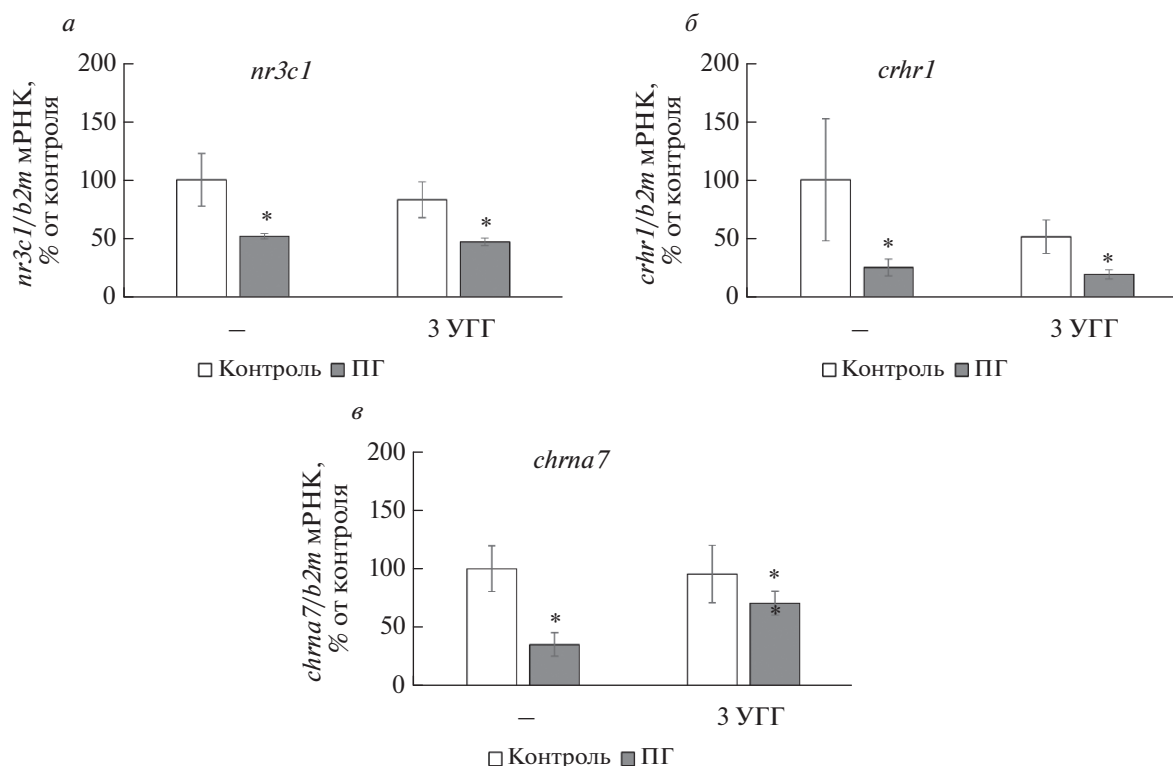


Рис. 2. Относительное содержание мРНК глюкокортикоидного рецептора *nr3c1* (а) и глюкокортикоид-зависимых генов рецептора кортиколиберина 1го типа *crhr1* (б) и $\alpha 7$ субъединицы рецептора ацетилхолина *chrna7* (в) в гиппокампе 2-недельных контрольных крысят и крысят, переживших ПГ на 14–16 сут эмбриогенеза, с последующими сеансами 3 УГГ на 8–10 сут постнатального развития либо без них. Данные нормированы на количество мРНК бета-2 микроглобулина *b2m* и представлены в % от контроля. * Различия с контролем статистически достоверны, $p \leq 0.05$ (U-критерий Манна–Уитни).

показано в настоящем исследовании, базальное количество 5HT7R в гиппокампе крысят, подвергавшихся пренатальной гипоксии, увеличено, что может быть рассмотрено как компенсаторный эффект недостаточного количества NR3C1 или же как следствие недостаточной серотониновой стимуляции исследуемой структуры мозга.

Вопреки нашему предположению, согласно которому увеличение серотониновой стимуляции гиппокампа вследствие сеансов умеренной гипобарической гипоксии должно способствовать нормализации уровня NR3C1 в этой структуре мозга крыс, переживших ПГ [11–15], гипотеза не оправдалась. Характерный для гипоксических состояний усиленный выброс серотонина [13] при изначально высоком уровне 5HT7R в гиппокампе ПГ крыс в ответ на сеансы умеренной гипоксии не привел ни к коррекции экспрессии глюкокортикоидных рецепторов NR3C1, ни, соответственно, к нормализации глюкокортикоид-зависимой транскрипции. Таким образом, сеансы умеренной гипоксии, предъявляемой на 8–10 сут постнатального онтогенеза ПГ крысам, не оказались в полной мере эффективным подходом для коррекции дисфункции глюкокортикоидной системы в гиппокампе развивающихся крыс, перенесших пренатальную гипоксию, однако способствовали нормализации количества серотониновых рецепторов.

Известно, что глюкокортикоиды негативно регулируют продукцию серотонина в ядрах шва [16]. При этом ядра шва у крыс формируются существенно раньше предъявляемых нами сеансов гипоксии [1] и, в отличие от гиппокампа, их развитие не должно быть подвержено влиянию стрессорного ответа материнского организма на гипоксию. В связи с этим наблюдаемое в данной работе увеличение экспрессии 5HT7R в гиппокампе крыс, подвергавшихся пренатальной гипоксии, может свидетельствовать о наличии дефицита серотониновой стимуляции данной структуры мозга вследствие избыточной глюкокортикоид-зависимой транскрипции в ядрах шва и, как следствие, ослабления синтеза и усиления деградации серотонина в этой структуре мозга. В свою очередь, нормализация количества 5HT7R в гиппокампе сеансами умеренной гипоксии животных, перенесших пренатальную гипоксию, вероятно отражает нормализацию активности серотониновой системы с помощью этого подхода.

В связи с существенной ролью серотонинергической системы мозга в развитии депрессивных расстройств [17, 18], дальнейшие детальные исследования особенностей взаимодействия серотонинергической и глюкокортикоидной систем в мозге крыс, подвергавшихся пренатальной гипоксии, позволят прояснить конкретные механизмы

формирования предрасположенности к депрессии в результате нарушений пренатального онтогенеза. Исследования отсроченных эффектов сеансов умеренной гипоксии на функциональную активность ядер шва, рецепцию серотонина экстрагипоталамическими структурами мозга и устойчивость животных к стрессовым воздействиям позволят прояснить значимость нормализации количества гиппокампальных серотониновых рецепторов в коррекции последствий пренатальной гипоксии.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Golan H., Huleihel M. // Dev. Sci. 2006. V. 9. № 4. P. 338–349.
- Rice D., Barone S. // Environ. Health Perspect. 2000. V. 108. P. 511–533.
- Piešová M., Mach M. // Physiol. Res. 2020. V. 69. № 2. P. 199–213.
- Vetrovoy O., Stratilov V., Nimiritsky P., Makarevich P., Tyulkova E. // Neurochem. Res. 2021. V. 46. № 3. P. 550–563.
- Camm E.J., Cross C.M., Kane A.D., Tarry-Adkins J.L., Ozanne S.E., Giusanni D.A. // FASEB J. 2021. V. 35. № 5.
- Dudley K.J., Xiang L., Kobor M.S., Kippin T.E., Bredy T.W. // Neurosci. Biobehav. Rev. 2011. V. 35. № 7. P. 1544–1551.
- Xiong F., Zhang L. // Front. Neuroendocrinol. 2013. V. 34. № 1. P. 27–46.
- Nalivaeva N.N., Turner A.J., Zhuravin I.A. // Front. Neurosci. 2018. V. 12.
- Wang B., Zeng H., Liu J., Sun M. // Front. Neurosci. 2021. V. 15.
- Vetrovoy O., Tyulkova E., Stratilov V., Baranova K., Nimiritsky P., Makarevich P., Rybnikova E. // Dev. Neurosci. 2021. V. 42. P. 145–158.
- Berumen L.C., Rodriguez A., Miledi R., Garcia-Alcocer G. // Sci. World J. 2012. V. 2012. P. 1–15.
- Laplante P., Diorio J., Meaney M.J. // Dev. Brain Res. 2002. V. 139. № 2. P. 199–203.
- Erdemli G., Crunelli V. // Neurosci. 2000. V. 96. № 3. P. 565–574.
- Rybnikova E., Mironova V., Pivina S., Tulkova E., Ordyan N., Nalivaeva N., Turner A., Samoilov M. // Psychoneuroendocrinology. 2007. V. 32. № 7. P. 813–823.
- Баранова К.А., Пивина С.Г., Рыбникова Е.А. // Нейрохимия. 2018. № 2. С. 126–131.
- Morsink M.C., Steenbergen P.J., Vos J.B., Karst H., Joels M., De Kloet E.R., Datson N.A. // J. Neuroendocrinol. 2006. V. 18. № 4. P. 239–252.
- Kraus C., Castrén E., Kasper S., Lanzenberger R. // Neurosci. Biobehav. Rev. 2017. V. 77. P. 317–326.
- Yagishita S. // Psychiatry. Clin. Neurosci. 2020 V. 74. № 2. P. 91–98.

Possible Correction of Impaired Hippocampal Glucocorticoid System in Rats Induced by Prenatal Hypoxia

O. V. Vetrovoy^{a, b}, V. A. Stratilov^a, E. V. Lomert^c, and E. I. Tyulkova^a

^a Pavlov Institute of Physiology, RAS, St. Petersburg, Russia

^b St. Petersburg University, St. Petersburg, Russia

^c Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg, Russia

In 2-weeks old rat pups we studied an effect of neuroprotective treatment by triple mild hypobaric hypoxia (3МНН), which has been applied on days 8-10th of postnatal development, on the content of serotonin receptors of type 7 (5HT7R), relative mRNA levels of glucocorticoid receptors (*nr3c1*) and also glucocorticoid-dependent genes of the CRH receptor of type 1 (*crhr1*) and $\alpha 7$ subunits of acetylcholine receptor (*chrna7*) in the hippocampus of control rat pups and pups that survived prenatal hypoxia (PH). PH leads to an increase in the 5HT7R levels but decreases levels of mRNA of the glucocorticoid receptor (*nr3c1*) gene, as well as of mRNA of the glucocorticoid-dependent genes (*crhr1*, *chrna7*) in the hippocampus. Three sessions of mild hypoxia reduced the levels of 5HT7R in rat hippocampus to the control but did not affect those parameters in the control group. 3МНН did not affect the levels of *nr3c1*, *crhr1* and *chrna7* mRNA in the hippocampus of the control and PH rat pups. The results indicate that stimulation of rat brain in the perinatal period by three sessions of mild hypoxia is not a sufficiently effective method for correcting the changes in the hippocampal glucocorticoid system, caused by prenatal hypoxia but suggest possible delayed beneficial effects of this method.

Keywords: prenatal hypoxia, mild hypobaric hypoxia, hippocampus, 5HT7R, glucocorticoid receptors, glucocorticoid-dependent transcription

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ**

УДК 577.151.63

**ВЛИЯНИЕ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА НА АКТИВНОСТЬ
ГЛУТАТИОНЗАВИСИМЫХ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ
В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ НЕЙРОНОВ И НЕЙРОГЛИИ
НЕОКОРТЕКСА У КРЫС В ПЕРИОД ИНТЕНСИВНОЙ МИЕЛИНИЗАЦИИ**© 2022 г. А. В. Вьюшина¹, А. В. Притворова¹ *, О. Г. Семенова¹, Н. Э. Ордян¹¹ *Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, Россия*

Поступила в редакцию 16.12.2021 г.

После доработки 11.03.2022 г.

Принята к публикации 21.03.2022 г.

Исследовали влияние пренатального стресса на активность глутатионзависимых ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии неокортекса у крыс-самцов в возрасте 20 дней (в период интенсивной миелинизации). У пренатально стрессированных животных по сравнению с контрольными животными выявлены следующие изменения. Активность глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.9) в цитозоле и ядерной фракции нейронов и нейроглии возрастала, а в митохондриальной фракции снижалась. Активность глутатионредуктазы (КФ 1.8.1.7) возрастала в цитозоле и фракции ядер нейроглии. Активность глутатионтрансферазы (КФ 2.5.1.18) увеличивалась в митохондриях нейронов и цитозоле нейроглии и снижалась в ядерной фракции нейронов и в митохондриях нейроглии. Высказано предположение, что изменения в активности исследованных ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии неокортекса, выявленные у пренатально стрессированных крысят в возрасте 20 дней, негативно влияют на процессы миелинизации в неокортексе, и могут способствовать ускоренному старению и развитию нейродегенеративных заболеваний у взрослых животных.

Ключевые слова: пренатальный стресс, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, глутатионтрансфераза, нейроны, нейроглия, субклеточные фракции, миелинизация

DOI: 10.31857/S102781332203013X

ВВЕДЕНИЕ

Многочисленные исследования стрессорных воздействий на нейроглиальные взаимосвязи выявили критически важные периоды в процессах нейрогенеза и глиогенеза. Нарушение формирования нейроглиальных комплексов в такие периоды, несомненно, сказывается и на функционировании взрослого организма. Последствием данного нарушения будут изменения дифференцировки коры в процессе пренатального онтогенеза [1]. Крыса является удобным модельным объектом для исследования этих процессов, поскольку у данного животного хорошо изучены критические периоды как пре- так и постнатального онтогенеза. Одним из таких периодов формирования неокортекса для крысы считается период второй и третьей недели постнатального развития. Отмечается, что к 20 дням у крысят фиксируется максимальная исследовательская активность [2]. В это же время вес неокортекса у крыс наряду с другими структура-

ми мозга достигает максимальных значений [2]. Показано, что рост тел нейронов в коре завершается к 17–20-му дням. В эти же сроки происходит интенсивная миелинизация в глубоких слоях коры, кроме того в первые 3 недели постнатального развития происходит интенсивный синаптогенез, а также к концу 3-ей недели постнатального развития устанавливается максимальное потребление кислорода в мозге [3].

Как известно, одним из последствий воздействия пренатального стресса (ПС) является генерация чрезмерного количества активных форм кислорода (АФК), осуществляемая различными механизмами. Орган-специфический ответ зависит от относительного баланса между генерацией АФК и антиоксидантными ресурсами клетки [4, 5]. В работе Флерова и соавт. [6] не было выявлено отличий в уровне диеновых конъюгатов и оснований Шиффа в неокортексе у пренатально стрессированных крыс в возрасте 20 дней по сравнению с контрольной группой того же возраста. Однако, при исследовании нейронов и нейроглии, выделенных из неокортекса у пренатально стрессиро-

* Адресат для корреспонденции: 199034 Россия, Санкт-Петербург, наб. Макарова, д.6, e-mail: prityorovaav@infran.ru.

ванных крыс в возрасте 20 дней, уровни диеновых и триеновых конъюгатов и оснований Шиффа оказались сниженными в нейроглии по сравнению с контрольной группой. В этом же исследовании было обнаружено повышение уровня окислительной модификации белков, как в нейронах, так и в нейроглии у пренатально стрессированных 20-дневных самцов крыс по сравнению с контролем. При этом активность такого антиоксидантного фермента как Cu-Zn-супероксиддисмутазы была ниже в нейронах, а в нейроглии не изменялась [7].

В предыдущем нашем исследовании [8] нами были выявлены изменения в активности глутатионзависимых антиоксидантных ферментов в нейронах и нейроглии у взрослых пренатально стрессированных крыс. Однако эти изменения, несомненно, являются результатом процессов, протекающих на более ранних стадиях пре- и постнатального онтогенеза, в особенности в критические периоды.

В связи с этим целью данной работы было изучение активности антиоксидантных глутатионзависимых ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии у пренатально стрессированных крысят в возрасте 20 дней, который является критически важным для процессов нейрогенеза и глиогенеза и формирования неокортекса.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Работа проведена на животных из питомника Института физиологии им. И.П.Павлова РАН, с соблюдением рекомендаций по этике работы с животными, предложенными Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. Опыты проводили на крысах линии Wistar. Животные содержались в стандартных условиях вивария при 12-часовом световом режиме и свободном доступе к пище и воде. Все манипуляции с животными проводили в период с 9 до 11 ч утра.

Для получения пренатально стрессированного потомства первородящих беременных самок (возраст 5 мес., вес 250–270 г) подвергали одностороннему иммобилизационному стрессу в условиях повышенной освещенности с 15-го по 19-й день гестации [9]. В эксперименте использовано 12 самок (6 самок – контрольная группа, 6 самок – группа, подвергавшаяся стрессу), к которым подсаживали самцов (1 самец к 3 самкам). У самок ежедневно брали мазки с целью определения фазы эстрального цикла. Нулевым днем беременности считали день, когда в вагинальном мазке самки, находящейся в стадии эструса, обнаруживались сперматозоиды. На 18-й день беременности самок рассаживали по отдельным клеткам, где они находились до родов и в процессе выкармливания потомства. Далее из каждого помета отбирали

случайным образом (без использования слепого метода) по 4 самца в возрасте 20 дней.

Крыс-самцов декапитировали, из черепной коробки извлекали мозг, из которого на льду выделяли неокортекс обоих полушарий от 4 особей в одну пробу, всего 6 проб ($n = 6$). Таким образом, в эксперименте использовалось 48 самцов крыс (24 крысы – контрольная группа, 24 крысы – пренатально стрессированная (ПС) группа).

Клеточные фракции, обогащенные нейронами и нейроглией, выделяли по методу Селлинджера в модификации Флерова [10]. Принцип метода заключается в получении клеточной суспензии с последующим выделением и очисткой нейрональной и нейроглиальной фракций ультрацентрифугированием (ультрацентрифуга VAC-60, ротор SWOUT 50×3, Германия) в градиенте плотности сахарозы и фиколла (сахароза, “Вектон”, Россия; Ficoll 400, “Merck”, Германия). При этом клеточную суспензию получали путем дезинтеграции ткани при пропускании ее через нейлоновые и металлические сита с последовательно уменьшающимся размером пор. Для облегчения дезинтеграции ткань предварительно обрабатывали раствором поливинилпирролидона (PVP-K30, “Merck”, Германия). После выделения фракции нейронов и нейроглии отмывали от сахарозы физиологическим раствором и затем центрифугировали в течение 10 минут в центрифуге при 3500g (центрифуга Eppendorf 5430R, Германия). Полученный осадок гомогенизировался (гомогенизатор Поттера, Sartorius, Германия), в 1 мл 0.25 М растворе сахарозы, содержащем 1 мМ ЭДТА (“Вектон”, Россия), pH 7,4 (для нейронов), или в эквивалентном объему осадка объеме 0.25 М раствора сахарозы, содержащем 1 мМ ЭДТА, pH 7.4 (для нейроглии). Далее выделение субклеточных фракций производилось стандартным методом дифференциального центрифугирования как описано ранее [11].

Активность ферментов глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР) и глутатионтрансферазы (ГТ) определялась с помощью наборов (Glutathione Peroxidase Assay Kit CatNo:EGPX-100, Glutathione Reductase Kit CatNo:ECGR-100, Glutathione S-transferase Assay Kit CatNo:DGST-100, BioAssay Systems, USA) на фотометре Thermo Scientific multiscan fs, USA. За единицу активности исследованных ферментов принимали количество нмоль продукта реакции, образовавшегося за 1 мин в расчете на 1 мг белка (нмоль/мин/мг белка). Количество общего белка определялось по методу Лоури.

Статистическая обработка полученных результатов производилась с использованием критерия сравнения U (Манна–Уитни) в программе “IBM SPSS Statistics 21”. Проверку нормальности распределения значений рассматриваемых групп проводили с помощью критерия Шапиро–Уилка

Таблица 1. Активность глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР) и глутатионтрансферазы (ГТ) (нмоль/мин/мг белка) в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии неокортекса контрольных крыс в возрасте 20 дней, Me(IQR), ($n = 6$ во всех группах)

	Нейроны			Нейроглия		
	Ц	Я	М	Ц	Я	М
ГПО	27.7 (18.5–38.9)	ND	401.5 (229–574)	6.17 (1.8–9.7) [#]	21.3 (11.1–40.8) [#]	137.0 (114–229) [#]
ГР	ND	13.1 (8.8–17.6)	ND	14.3 (0–17.9) [#]	28.1 (25–31.2) [#]	ND
ГТ	7.9 (7.8–11.5)	2.1 (0–2.7)	ND	1.1 (1.06–1.19) [#]	9.2 (9.2–9.6) [#]	17.3 (13.8–34.6) [#]

Примечание: Me(IQR), где Me – медиана, IQR – интерквартильный размах между значениями 25–75 перцентилей, Ц – цитозоль, Я – фракция ядер, М – фракция митохондрий, ND – активность не определялась, # отличие нейроглии от нейронов при $p < 0.05$

Таблица 2. Активность глутатионпероксидазы (ГПО), глутатионредуктазы (ГР) и глутатионтрансферазы (ГТ) (нмоль/мин/мг белка) в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии неокортекса пренатально стрессированных крыс в возрасте 20 дней, Me(IQR), ($n = 6$ во всех группах)

	Нейроны			Нейроглия		
	Ц	Я	М	Ц	Я	М
ГПО	305.5 (305.5–496)*	9.2 (5.1–10.2)*	ND*	99.4 (66.9–121.6)*	85.1 (76.1–107.7)*	ND*
ГР	ND	11.6 (10.0–19.6)	ND	22.4 (16.1–29.5)*	35.4 (19.6–41.2)	ND
ГТ	8.6 (6.9–9.5)	ND*	27.7 (15.6–44.9)*	5.2 (4.8–5.9)*	9.9 (6.4–12.7)	5.2 (0–6.4)*

Примечание: Условные обозначения как в табл. 1. * Отличие группы пренатально стрессированных крыс от группы контроля при $p < 0.05$

(Shapiro–Wilks test). Проверку статистических гипотез проводили при уровне значимости $p < 0.05$. При описании количественных данных использовались следующие показатели: Me – медиана, IQR – интерквартильный размах между значениями 25–75 перцентилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данные, полученные при исследовании активности ферментов глутатионового пула в цитозоле, фракциях ядер и митохондрий нейронов и нейроглии в контрольной группе крыс в возрасте 20 дней, представлены в табл. 1.

Из трех исследованных ферментов в цитозоле нейронов активность у ГР не проявлялась. Во фракции ядер была выявлена активность ГР и ГТ, а активность ГПО не проявлялась. В митохондриальной фракции нейронов не выявлена активность ГР и ГТ.

В цитозоле нейроглии активность ГПО и ГТ была ниже по сравнению с нейронами, кроме того была выявлена активность ГР в отличие от

нейронов ($p < 0.05$). В ядерной фракции нейроглии активность всех трех ферментов была более высокой по сравнению с активностью ферментов в ядерной фракции нейронов ($p < 0.05$). Во фракции митохондрий нейроглии активность ГПО была более низкой, чем у нейронов во фракции митохондрий ($p < 0.05$). Активность ГР во фракции митохондрий нейроглии не выявлена также, как и в митохондриальной фракции нейронов. Но была выявлена активность ГТ во фракции митохондрий нейроглии. Следует отметить на порядок более высокую активность ГПО в митохондриальной фракции как нейронов, так и нейроглии, по сравнению с активностью данного фермента во всех других фракциях. Также обращает на себя внимание отсутствие активности ГР в митохондриальной фракции как нейронов, так и нейроглии.

Изменение активности исследованных ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии у пренатально стрессированных крыс в возрасте 20 дней показано в табл. 2.

У пренатально стрессированных животных в цитозоле нейронов активность ГПО повышалась

Таблица 3. Изменение активности исследованных глутатионовых ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии у пренатально стрессированных крыс по сравнению с контрольной группой

	Нейроны			Нейроглия		
	Ц	Я	М	Ц	Я	М
ГПО	↑	↑	↓	↑	↑	↓
ГР	—	—	—	↑	—	—
ГТ	—	↓	↑	↑	—	↓

Примечание: Условные обозначения как в табл. 1. “↓” снижение активности, “↑” увеличение активности, “—” отсутствие изменений.

в 10 раз по сравнению с контролем, активность ГР так же, как и в контроле, не проявлялась, а активность ГТ не изменялась по сравнению с контролем. Во фракции ядер нейронов в отличие от контроля выявлена активность ГПО, а активность ГР не имела достоверных отличий от контроля, тогда как активность ГТ выявлена не была. В митохондриальной фракции нейронов ПС животных активность ГПО и ГР не выявлялась, тогда как активность ГТ, в отличие от контроля, была определяема.

В нейроглии у пренатально стрессированных крыс активность всех исследованных ферментов в цитозоле увеличивалась по сравнению с контрольными крысами ($p < 0.05$). В ядерной фракции достоверно увеличивалась активность ГПО ($p < 0.05$), тогда как активности ГТ и ГР не отличались от этих показателей у контрольной группы. Во фракции митохондрий активность ГПО не проявлялась в отличие от контроля, активность ГТ снижалась по сравнению с контролем, а активность ГР, так же, как и у контрольных животных, была не определяема.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашем предыдущем исследовании [8] мы выявили эффекты пренатального стресса на активность антиоксидантных ферментов глутатионового пула в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии в неокортексе у половозрелых самцов крыс. Нами был сделан вывод о том, что у взрослых крыс изменения в активности исследованных ферментов носят как компенсаторный, так и патологический характер. Однако, для поведенческих и когнитивных свойств и вероятности развития нейродегенеративных заболеваний у взрослых индивидов также имеет значение формирование нейроглиальных взаимоотношений в онтогенезе. Поэтому в настоящем исследовании были рассмотрены ювенильные крысы в возрасте 20 дней, когда наблюдается максимальная интенсивность процессов, связанных с миелинизацией [3]. В литературе отмечается тот факт, что мозг во время

раннего постнатального развития обладает значительным запасом низкомолекулярных антиоксидантов, тогда как концентрации антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и ГПО относительно низки [12]. Однако, следует отметить, что большее значение имеет именно активность антиоксидантных ферментов, а не их абсолютное количество. Результаты данного исследования показали, что у 20-дневных крысят в контрольной группе активность ферментов во фракции ядер нейроглии выше по сравнению с нейронами (табл. 1). Можно предположить, что для нейроглии наиболее важно поддержание необходимого уровня антиоксидантной активности глутатион-зависимых ферментов именно во фракции ядер. В то же время в нейронах активность ГПО в цитозоле и в митохондриальной фракции выше почти в 4 раза по сравнению с нейроглией. Эти данные позволяют предположить, что возможность поддерживать более низкий уровень АФК в нейронах, чем в нейроглии [13] на ранних стадиях онтогенеза осуществляется не только благодаря специфической организации комплекса 1 в митохондриях [14], но и благодаря повышенной активности ГПО. В то же время у 20-дневных крысят высокая активность ГПО по сравнению с остальными исследованными ферментами наблюдается во фракции митохондрий и в нейронах и в нейроглии. По-видимому, это важно для жизнеспособности и выживания развивающихся нейронов [15]. Активность ГТ в ядерной и митохондриальной фракциях значительно выше в нейроглии по сравнению с нейронами, в то время как активность ГТ в цитозоле нейронов выше, чем в нейроглии. ГТ является важным регулятором активности Nrf-2 (ядерный-эритроид-связанный фактор 2) [16], который в свою очередь через ARE (антиоксидант-респонсивный элемент) индуцирует экспрессию широкого спектра антиоксидантных ферментов, в том числе связанных с синтезом и метаболизмом глутатиона [17]. Такая картина в период усиленной миелинизации может объясняться необходимостью регуляции антиоксидантного статуса через Nrf-2 не только в нейроглии, но и в нейронах, поскольку непосредственно сами нейроны участвуют в регуляции процессов миелинизации как показано в исследовании Simons и соавт. [18].

Изменения активности исследованных ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии у 20-дневных крысят в результате воздействия ПС в виде схемы представлены в табл. 3.

Как видно из табл. 3, активность ГПО в митохондриальной фракции нейронов и нейроглии у пренатально стрессированных крыс ниже по сравнению с контрольной группой. И, если в нейронах это отчасти компенсируется появлением активности ГТ, то в нейроглии активность ГТ снижается в 3 раза. Вероятно, ПС создает сбой в энергетических процессах, что не может не сказаться на про-

Таблица 4. Сравнение активности исследованных глутатионовых ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии у контрольных крыс в возрасте 90 дней по сравнению с контрольными крысами в возрасте 20 дней

	Нейроны			Нейроглия		
	Ц	Я	М	Ц	Я	М
ГПО	↑ (27–274)	– (ND–7)	↓ (401–ND)	↑ (6–32)	– (21–29)	↑ (137–898)
ГР	– (ND–ND)	↓ (13–ND)	– (ND–ND)	↑ (14–41)	– (28–36)	– (ND–ND)
ГТ	↓ (7–ND)	↑ (2–6)	– (ND–ND)	↑ (1–13)	↑ (9–25)	↑ (17–79)

Примечание: Условные обозначения как в табл. 1. “↓” снижение активности, “↑” увеличение активности, “–” отсутствие изменений, в скобках указаны (А–В), А – значение активности фермента у крыс в возрасте 20 дней, В – значение активности фермента у крыс в возрасте 90 дней. Значения активности ферментов представлено в виде медиан (Ме).

Таблица 5. Сравнение активности исследованных глутатионовых ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии у пренатально стрессированных крыс в возрасте 90 дней по сравнению с группами пренатально стрессированных крыс в возрасте 20 дней

	Нейроны			Нейроглия		
	Ц	Я	М	Ц	Я	М
ГПО	↓ (305–23)	↑ (9–28)	↑ (ND–164)	↑ (99–197)	↓ (85–62)	↑ (ND–244)
ГР	– (ND–ND)	↑ (11–29)	– (ND–ND)	↑ (22–77)	– (35–43)	– (ND–ND)
ГТ	↓ (8–ND)	↑ (ND–6)	↑ (28–63)	↑ (5–18)	↑ (9–20)	↑ (5–74)

Примечание: Условные обозначения как в табл. 1. “↓” снижение активности, “↑” увеличение активности, “–” отсутствие изменений, в скобках указаны (А–В), А – значение активности фермента у крысы в возрасте 20 дней, В – значение активности фермента у крысы в возрасте 90 дней, значения активности ферментов представлено в виде медиан (Ме).

цессах миелинизации у ювенильных крысят и может способствовать развитию нейродегенеративных заболеваний [19]. При этом в цитозоле нейроглии после ПС активность всех трех исследованных ферментов повышается, а в цитозоле нейронов возрастает только активность ГПО. Можно предположить, что в нейроглии активизируются антиоксидантные механизмы, позволяющие компенсировать негативные последствия ПС в неокортексе. Это подтверждается полученными ранее результатами о неизменном уровне перекисного окисления липидов и окислительных модификаций белка в нейронах и нейроглии [7], а также о менее эффективной глутатионовой системе детоксикации пероксидов нейронов [20] и данными о большей устойчивости к ишемии ювенильных олигодендроцитов [21].

Во фракции ядер нейронов после ПС активность ГТ не выявляется, в то время, как выявляется активность ГПО, что возможно имеет компенсаторный характер. Следует отметить, что и у пренатально стрессированных крысят и у контрольных крысят во фракции ядер нейроглии активность исследованных ферментов выше по сравнению с нейронами (см. табл. 1 и 2). Сходное с контрольными животными распределение активности исследованных ферментов во фракции ядер нейроглии у пренатально стрессированных крыс может свидетельствовать о сохранности механизмов антиок-

сидантной защиты генетического материала этой клеточной популяции.

Чтобы проследить влияние изменений активности исследованных ферментов в критическом для постнатального формирования нейроглиальных взаимоотношений в возрасте (20 дней) на активность данных ферментов у взрослых животных, мы сравнили возрастные изменения отдельно у контрольных и у пренатально стрессированных крыс с использованием полученных нами ранее данных [8], что показано в табл. 4 (контроль) и табл. 5 (ПС).

Как видно из представленных в табл. 4 данных, для контрольных животных характерно значительное снижение с возрастом активности исследованных ферментов в нейронах, за исключением ГПО в цитозоле. Тогда как в нейроглии, напротив, с возрастом увеличивается активность всех изученных антиоксидантных ферментов. Особенно заметно это увеличение для ГПО в цитозоле (в 5 раз) и в митохондриальной фракции (в 6 раз). В работах Галкиной и соавт. [22, 23] было показано, что активность антиоксидантных ферментов глутатионового пула у 20-дневных крысят в мозге ниже, чем у взрослых животных. Авторы связывают это с влиянием данных ферментов на соотношение GSH/GSSG, полагая, что это может являться фактором “переключения” фазы пролиферации и фазы дифференцировки нервных клеток. Одновременно, это может быть связано с

формированием специфических суперкомплексов из комплекса I в митохондриях нейронов и выработке большого количества АФК в глиальных клетках [14].

При рассмотрении возрастной динамики у пренатально стрессированных крыс (табл. 5) обращает на себя внимание снижение у 90-дневных животных активности ГПО в цитозоле нейронов (в 13 раз) и появление активности этого фермента в митохондриальной фракции нейронов (164 нмоль/мин/мг белка), тогда как у пренатально стрессированных крыс в возрасте 20 дней активность данного фермента не выявлена. Кроме того, у взрослых (90 дней) пренатально стрессированных животных повышалась активность ГТ во фракции митохондрий нейронов, в то время как в контроле активность этого фермента не выявлялась на обоих сроках развития (см. табл. 4). Таким образом, в нейронах у пренатально стрессированных крыс в процессе созревания наблюдаются разнонаправленные изменения по сравнению с контрольными животными в активности ГПО в цитозоле и митохондриальной фракции.

В цитозоле нейроглии у пренатально стрессированных крыс с возрастом происходит увеличение активности всех изученных ферментов также, как у контрольных крыс. Однако, следует отметить, что, как в возрасте 20, так и 90 дней у пренатально стрессированных крыс в цитозоле нейроглии уровень активности всех исследованных ферментов выше, чем у контрольных животных. При рассмотрении изменений от 20 к 90 дням в нейроглии у контрольных животных видно, что активность ГПО в митохондриальной фракции увеличивается в 6 раз до 898 нмоль/мин/мг белка (табл. 4), тогда как активность этого фермента у пренатально стрессированных животных изменяется от неопределяемых величин до 244 нмоль/мин/мг белка (табл. 5). Одновременно активность ГТ во фракции митохондрий нейроглии у пренатально стрессированных животных достигает значений, сравнимых с контрольными животными в возрасте 90 дней (табл. 5), возрастая в 14.8 раза, тогда как у контрольных животных активность этого фермента, имея более высокий уровень на 20-й день, вырастает к 90-му дню лишь в 4.6 раза (табл. 4). По-видимому, ПС не изменяет программу формирования нейроглиальных комплексов, но обуславливает изменение скорости морфогенетических процессов, что возможно связано с одновременно протекающими процессами дифференцировки, патологическими изменениями и компенсаторными процессами. Как указывается в опубликованных нами ранее работах [6, 7] ПС оказывает наибольшее влияние на свободнорадикальное окисление белков и перекисное окисление липидов в нейронах и нейроглии у 20-дневных животных по сравнению с взрослыми животными. Однако такая перестройка возрастной

динамики окислительной модификации биомолекул может свидетельствовать о процессах адаптации ткани, вынужденной развиваться в условиях многочисленных десинхронозов. При этом драматические перестройки метаболизма в процессе онтогенеза у пренатально стрессированных крыс в результате взаимодействия субклеточных популяций приводят к компенсации патологических изменений по показателям перекисного окисления липидов и окислительной модификации белков в неокортексе у взрослых крыс. Приведенные выше сравнительные данные могут указывать на то, что у пренатально стрессированных животных в значительной степени включаются компенсаторные механизмы антиоксидантной активности как в нейронах, так и в нейроглии. Однако при рассмотрении масштабов этой компенсации можно предположить нарушение функционирования митохондрий у пренатально стрессированных животных, которое не позволяет исследованным антиоксидантным ферментам достичь уровня активности, определяемой у контрольных животных. Постоянное включение компенсаторных механизмов подобного уровня, вероятно, может приводить к более быстрой “изнашиваемости” антиоксидантной системы и, как следствие, к ускоренному старению.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что пренатальный стресс приводит к изменению уровня активности глутатионзависимых антиоксидантных ферментов в субклеточных фракциях нейронов и нейроглии неокортекса у крыс в возрасте 20 дней. Анализ таких изменений позволяет сделать вывод о негативном влиянии ПС на процессы постнатального онтогенеза в неокортексе, и предположить, что одной из причин повышенной склонности пренатально стрессированных животных к нейродегенеративным заболеваниям и ускоренному старению являются изменения в активности глутатионзависимых ферментов как в нейронах, так и в нейроглии неокортекса. Для понимания патологических механизмов негативного влияния ПС на ЦНС необходимы исследования функций митохондрий у пренатально стрессированных животных. Дальнейшие исследования в этом направлении могут иметь важное значение для клинической практики при профилактике нейродегенеративных заболеваний и при их лечении митохондриально ориентированной терапией.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках Государственного задания Института физиологии им. И.П. Павлова РАН, тема № 0134-2019-0002 (65.1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все применяемые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Вклад авторов. Каждый из авторов в равной степени участвовал в планировании эксперимента, анализе литературы, работе с животными, биохимических исследованиях, статистической обработке и обсуждении результатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Отеллин В.А., Хожай Л.И., Ордян Н.Э.*, Пренатальные стрессорные воздействия и развивающийся головной мозг. СПб.: "Десятка", 2007. 240 с.
2. *Дмитриева Н.И.* // Журн. эвол. биохимии и физиологии. 1981. Т. 17. № 3. С. 287–292.
3. *Rice D., Barone S.* // Environmental Health Perspectives. 2000. V. 108. P. 511–533.
4. *Dennerly P.A.* // Fr. Rad. Biol. & Med. 2010. V. 49. P. 1147–1151.
5. *Thompson L.P. & Al-Hasan Y.* // Journal of Pregnancy. 2000. V. 2012. P. 1–8.
6. *Флеров М.А., Герасимова И.А., Вьюшина А.В.* // Нейрохимия. 2005. Т. 22. № 2. С. 102–107.
7. *Флеров М.А., Герасимова И.А., Вьюшина А.В., Притворова А.В.* // Рос. физиол. журнал. 2008. Т. 94. № 4. С. 406–413.
8. *Вьюшина А.В., Притворова А.В., Семенова О.Г., Ордян Н.Э.* // Нейрохимия. 2020. Т. 37. № 2. С. 148–152.
9. *Ордян Н.Э., Пивина С.Г.* // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2003. Т. 84. № 1. С. 52–59.
10. *Флеров М.А.* // Вопр. мед. химии. 1978. Т. 24. № 2. С. 174–180.
11. *Вьюшина А.В., Притворова А.В., Семенова О.Г., Ордян Н.Э.* // Биомедицинская химия. 2021. Т. 67. № 4. С. 347–351.
12. *Rao A.R., Quach H., Smith Ed., Vatassery G.T., Rao R.* // Neurosci. Lett. 2014. V. 568. P. 67–71.
13. *Rae C.D., Williams S.R.* // Analytical Biochemistry. 2017. V. 529. P. 127–143.
14. *Vicente-Gutierrez C., Bonora N., Bobo-Jimenez V., Jimenez-Blasco D., Lopez-Fabuel I., Fernandez E., Josephine C.* // Nature Metabolism. 2019. V. 1. P. 201–211.
15. *Lopez-Fabuela I., Le Douceb J., Loganc A., Jamesc A.M., Bonventob G., Murphyc M.P., Almeidad A., Bolañosa J.P.* PNAS. 2016. V. 113. № 46. P. 13063–13068.
16. *Кулинский В.И., Колесниченко Л.С.* // 2009. Биомед. химия. Т. 155. Вып. 3. С. 255–277.
17. *Fernandez-Fernandez S., Almeida A., Bolanos J.P.* // 2012. Biochem. J. V. 443. P. 3–12.
18. *Simons M., Trajkovic K.* // 2006. Journal of Cell Science. V. 119. № 21. P. 4381–4389.
19. *Barateiro A., Brites D., Fernandes A.* // Curr. Pharm. Des. 2016. V. 22. № 6. P. 656–679.
20. *Dringen R., Kussmaul L., Gutterer J.M., Hirrlinger J., Hamprecht B.* // J. of Neurochemistry. 1999. V. 72. № 6.
21. *Ahrendsen J.T., Grewal H.S., Hickey S.P., Culp C.M. et al.* // Glia. 2016. V. 64. № 11. P. 1972–1986.
22. *Бахтюков А.А., Галкина О.В., Ещенко Н.Д.* // Нейрохимия. 2016. Т. 33. № 3. С. 215–221.
23. *Галкина О.В., Бахтюков А.А., Ахметшин М.О., Прокопенко В.М., Ещенко Н.Д.* // Нейрохимия. 2017. Т. 34. № 4. С. 263–269.

The Effect of Prenatal Stress on Glutathione-Associated Antioxidant Enzyme Activity in Subcellular Fractions of Neocortical Neurons and Neuroglia of Rats during the Period of Intensive Myelination

A. V. Vyushina^a, A. V. Pritvorova^a, O. G. Semenova^a, and N. E. Ordyan^a

^a Pavlov Institute of Physiology of the RAS, St. Petersburg, Russia

The effect of prenatal stress on the activity of glutathione-associated enzymes in subcellular fractions of neurons and neuroglia from the neocortex of 20-day old male rats (during the period of intensive myelination) was studied. The following changes have been observed in prenatally stressed animals compared to the control. The activity of glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9) in the cytosol and the nuclear fraction of neurons and neuroglia increased but decreased in the mitochondrial fraction. The activity of glutathione reductase (EC 1.8.1.7) increased in the cytosol and in the nuclear fraction of the neuroglia. The activity of glutathione transferase (EC 2.5.1.18) increased in the mitochondrial fraction of neurons and in the cytosol of neuroglia but decreased in the nuclear fraction of neurons and in the mitochondrial fraction of neuroglia. It suggests, that the changes in the activity of the studied enzymes in the subcellular fractions of neocortical neurons and neuroglia in prenatally stressed rats observed at the age 20 days negatively affect the processes of myelination in the neocortex, and may contribute to accelerated aging and development of neurodegenerative diseases in later life.

Keywords: prenatal stress, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, glutathione reductase, neurons, glia, subcellular fractions, myelinisation

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ**

УДК 57.02, 57.041, 618.3-008.6, 577.25

**ДЕЙСТВИЕ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ НА СОДЕРЖАНИЕ
НЕЙРОТРОФИНОВ В СТРУКТУРАХ МОЗГА БЕРЕМЕННЫХ КРЫС**© 2022 г. Ю. П. Милютин^{1, 2, *}, А. В. Арутюнян¹, А. Д. Щербицкая^{1, 3}, И. В. Залозня¹¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение “НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия² ФГБОУ ВО “Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет” Минздрава, Санкт-Петербург, Россия³ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 08.04.2022 г.

После доработки 11.05.2022 г.

Принята к публикации 13.05.2022 г.

Гипергомоцистеинемия (ГГЦ) матери во время беременности может приводить к нарушению развития нервной системы плода и вызывать отдаленные последствия, в том числе когнитивную дисфункцию, у потомства в постнатальном периоде. Нарушение процессов метилирования и развитие окислительного стресса (ОС) относятся к одним из основных механизмов нейротоксического действия гомоцистеина и его метаболитов. Изменение уровня нейротрофинов в гиппокампе самцов крыс является одним из установленных последствий воздействия ГГЦ на взрослый организм, однако такие исследования на самках отсутствуют. В данном исследовании проводился анализ влияния ГГЦ (пероральное введение метионина с 4-го по 20-й дни беременности) на содержание нейротрофинов в растворимой фракции различных структур мозга (гиппокамп, гипоталамус, кора больших полушарий, мозжечок) крыс на 20-й день беременности. Анализ суточной динамики содержания гомоцистеина в данных структурах при введении метионина проводили на 4-й день беременности. Полученные данные свидетельствуют, что на фоне отсутствия изменения уровней проформ фактора роста нервов (NGF) и нейротрофического фактора мозга (BDNF) в растворимой фракции коры и гипоталамуса беременных крыс при ГГЦ имеет место снижение содержания зрелой формы BDNF и повышение уровня ДНК-метилтрансферазы 1 (DNMT1) на 20-й день беременности. При этом в коре отмечено повышение уровня продуктов окислительной модификации белков. Значимых изменений исследованных показателей в гиппокампе обнаружено не было, что указывает на устойчивость данной структуры мозга к токсическому влиянию ГГЦ у беременных крыс. Таким образом, патологическое действие ГГЦ при беременности проявляется в коре и гипоталамусе, что может повлечь за собой развитие тревожно-депрессивных состояний, способных негативно сказаться на состоянии здоровья как будущей матери, так и, соответственно, развивающегося плода.

Ключевые слова: нейротрофический фактора мозга, фактора роста нервов, ДНК-метилтрансфераза, окислительный стресс, гипоталамус, гиппокамп, беременность

DOI: 10.31857/S1027813322030062

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время активно исследуются негативные последствия влияния различных видов стресса, в том числе и гипергомоцистеинемии (ГГЦ), во время беременности, на нервную систему потомства, как в раннем, так и позднем постнатальном периоде [1–4]. Однако, значительно меньше исследований посвящено изучению влияния стресса на самих матерей [5, 6]. В частности, практически игнорируется вклад нарушений, про-

исходящих в отдельных структурах мозга в развитие патологии беременности и послеродового периода. Влияние ГГЦ на изменение содержания нейротрофинов, в частности, нейротрофического фактора мозга (BDNF) и фактора роста нервов (NGF), в различных структурах мозга оценивается преимущественно в контексте когнитивных нарушений и психических расстройств у самцов или небеременных самок [7–11]. В связи с этим основными объектами исследования, как правило, являются гиппокамп и кора мозга. Известно также, что в развитии депрессии, принимают участие, наряду с нейротрансмиттерами и их рецепторами системы передачи внутриклеточных сигналов, процессы

* Адресат для корреспонденции: 199034 Россия, Санкт-Петербург, Менделеевская линия, д. 3; e-mail: milyuti-na1010@mail.ru.

транскрипции генов, трансляции белков и их посттрансляционные изменения, связанные с нейротрофическими нарушениями и снижением нейропластичности в различных отделах мозга [12–15]. При этом установлено, что повышенное содержание гомоцистеина (ГЦ) относится к числу неоспоримых факторов патогенеза таких осложнений беременности, как преэклампсия, отслойка плаценты, задержка внутриутробного развития плода и незаращение нервной трубки [16–18]. Предполагают, что негативное воздействие ГЦ на организм, в том числе, организм матери, является следствием развития под влиянием этого соединения и его активных метаболитов как окислительного стресса (ОС) [19, 20], так и связанных с ним процессов апоптоза и воспаления [21–23]. Кроме того, ГЦ обладает эксайтотоксическим эффектом ввиду его структурного сходства с глутаматом [24, 25]. Накопленные данные свидетельствуют о том, что взаимодействие между факторами окружающей среды и эпигенетическими процессами, такими как метилирование ДНК и модификации хроматина, может играть роль в реализации неблагоприятных эффектов ГЦ, включая его влияние на регуляцию гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [1]. Применение модели экспериментальной ГЦ во время беременности является важным инструментом для понимания механизмов возможного влияния ГЦ на экспрессию нейротрофических факторов в мозге матери, которое может быть связано как с усилением ОС и активацией зависимых от уровня АФК путей апоптоза [26], так и с изменением степени метилирования ДНК и структурной реорганизации генов, ответственных за синтез этих ростовых факторов [27, 28].

Таким образом, цель данной работы состояла в оценке влияния ГЦ во время беременности, вызванной метиониновой нагрузкой, на содержание нейротрофических факторов (BDNF и NGF), DNMT1 и продуктов окислительной модификации белков в различных структурах мозга самок крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные. Крысы линии Wistar были получены из Питомника лабораторных животных “Рапполово”, Ленинградская обл., Россия. Животных содержали в виварии с искусственной вентиляцией при постоянной комнатной температуре с контролируемым 12-часовым циклом света и темноты, и они получали стандартный коммерческий корм с содержанием белка 20% (ЗАО “Волосово”, “Волосовский комбикормовый завод”, Ленинградская обл., Россия) и воду.

Однократное введение метионина для анализа суточной динамики изменения уровня ГЦ в различных структурах мозга самок крыс. В данном экспе-

рименте использовали однократное пероральное введение 0.15%-го водного раствора L-метионина (0.6 г/кг массы животного) на 4-й день беременности. Исследование выполнено на 30 самках крыс. Уровень ГЦ оценивали в гипоталамусе, гиппокампе, коре и мозжечке на иммунохемилюминесцентном анализаторе “Architect i1000” (Abbott, США) до введения метионина, через 1, 3, 6 и 24 ч после его введения. Образцы тканей структур мозга были гомогенизированы на льду в соотношении 1 : 1 (w/v) в PBS, pH 7.4 (Sigma-Aldrich, США). Полученные гомогенаты центрифугировали при 16000 g в течение 20 мин для удаления клеточного дебриса. Концентрирование супернатантов проводили с использованием вакуумного концентратора Labconco (США). Концентрацию общего белка в пробах оценивали по методу Бредфорда на спектрофотометре NanoDrop One (Thermo Scientific, USA) [29].

Хроническое введение метионина для анализа содержания нейротрофинов, DNMT1 и окислительной модификации белков в различных структурах мозга беременных самок крыс. В эксперименте использовали хроническое ежедневное пероральное введение раствора L-метионина. Животные были разделены на две группы. Первая группа (контрольная, $n = 6$) состояла из самок крыс, находившихся на стандартном рационе с дополнительным ежедневным пероральным введением питьевой воды с 4 по 20 день беременности. Вторую группу ($n = 6$) составили самки, которым также в этот период беременности на фоне стандартного корма и воды ежедневно, один раз в сутки, перорально вводили 0.15%-й водный раствор L-метионина (0.6 г/кг массы животного). На 20-й день беременности самок обеих групп декапитировали, образцы ткани мозга хранили при -80°C до времени анализа.

Иммуноблоттинг. Образцы тканей структур мозга гомогенизировали на льду в соотношении 1 : 2 (w/v) в PBS, pH 7.4 (Sigma-Aldrich, США). Полученные гомогенаты центрифугировали при 16000 g и $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 20 мин для удаления нерастворенных белков и клеточного дебриса. Концентрацию общего белка в супернатантах оценивали по методу Бредфорда. Образцы с равным содержанием белка (50 мкг) смешивали с 2x буфером для образцов (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 25% глицерин, 0.01% бромфеноловый синий, 5% β -меркаптоэтанол) (Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad, США), инкубировали 5 мин при 98°C . Электрофорез проводили в денатурирующих условиях по методу Laemmli в 10%-м SDS-полиакриламидном геле (TGS Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, Bio-Rad, США), в трис-глициновом буфере (10x Tris/Glycine/SDS Buffer, Bio-Rad, США). Белки визуализировали с использованием технологии *stain-free* в системе геле-документации ChemiDocTM Touch Imaging system (Bio-Rad, США) и

переносили на PVDF-мембрану в трансфер-буфере (Bio-Rad, США), содержащем 20% этанола. Относительное содержание BDNF, NGF и DNMT1 выявляли с помощью специфических первичных антител Anti-BDNF [EPR1292] (rabbit Ab 1 : 1000, Abcam, США), anti-NGF [EP1320Y] (rabbit Ab 1 : 1000, Abcam, США), которые распознают иммунореактивные формы NGF ~ 30 кДа и DNMT1 (D63A6) (rabbit Ab, 1 : 1000, Cell Signaling Technology, США). После инкубации с HRP-конъюгированными козьими антителами против кролика или мыши (1 : 1000, Bio-Rad, США), сигналы регистрировали с помощью усиленной хемилюминесценции (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad, США). Интенсивность полос, полученных в результате иммуноблотинга, определяли с помощью программного обеспечения ImageLab. Полученные данные, были нормализованы по глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназе (GAPDH (14C10) Rabbit Ab, 1 : 1000, Cell Signaling Technology). Содержание показателей в каждой структуре мозга в группе животных с ГГЦ оценивали относительно его содержания в соответствующих структурах в группе контроля.

Определение окислительной модификации белков. Анализ осуществляли с использованием набора OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit (Merck Millipore, США) согласно протоколу производителя, в основе которого лежит метод дериватизации окисленных карбонильных групп белков при помощи 2,4-динитрофенилгидразина в течение 15 мин при комнатной температуре с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов белков [30]. Для этого к 5 мкл супернатанта, полученного способом, описанным выше, содержащего 15 мкг общего белка добавляли 5 мкл 12% SDS и 10 мкл раствора 2,4-динитрофенилгидразина и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Реакцию останавливали добавлением 7.5 мкл нейтрализующего буфера. После добавления 1.5 мкл β-меркаптоэтанола, 25 мкл образца, содержащего 13 мкг общего белка, загружали в лунки 10%-го SDS-полиакриламидного геля (TGS Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, Bio-Rad, США). Электрофорез проводили в трис-глициновом буфере (10× Tris/Glycine/SDS Buffer, Bio-Rad, США). Белки визуализировали с использованием технологии *stain-free* в системе гель-документации ChemiDoc™ Touch Imaging system (Bio-Rad, США) для последующей нормализации результатов, и переносили на PVDF-мембрану в трансфер-буфере (Bio-Rad, США), содержащем 20% этанола. Мембрану блокировали в 1%-м растворе бычьего сывороточного альбумина на TBS-буфере (pH 7.5), содержащем 0.1% Tween-20, в течение 1.5 ч и инкубировали с первичными антителами, специфичными к модифицированным карбонильным группам белков (Anti-DNP Rabbit Ab, 1 : 150, Merck Millipore, США). Далее, после инкубации с

соответствующими HRP-конъюгированными козьими моноклональными антителами (Goat Anti-Rabbit Ig (H + L)-HRP, 1 : 1000, BioRad, США) сигналы визуализировали с помощью усиленной хемилюминесценции (Clarity Western ECL Substrate BioRad, США). Денситометрическую интенсивность зоны разделения белков каждого образца, полученных в результате иммуноблотинга, анализировали с помощью программного обеспечения ImageLab (Bio-Rad, США). На основании существующих рекомендаций по нормализации содержания белка [31] полученные данные, которые оценивались как суммарная денситометрия всей зоны разделения белков каждого образца, были нормализованы по содержанию общего белка в геле, определяемого с помощью технологии *stain-free* (BioRad, США) согласно инструкции производителя с использованием программы ImageLab (Bio-Rad, США).

Статистическая обработка результатов. Нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для проверки равенства дисперсий использовали критерий Левена. Статистический анализ был выполнен с помощью программы STATISTICA 10.0. Статистическая обработка полученных данных проведена с использованием параметрического *t*-критерия Стьюдента для независимых выборок. При проведении множественного сравнения использован непараметрический *H*-критерий Крускала-Уоллиса. Непрерывные переменные с нормальным распределением представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка среднего ($M \pm SEM$). Медианы [25-ая–75-ая перцентили] использовались, когда нормальное распределение отсутствовало. Различия при $p < 0.05$ считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Повышение уровня гомоцистеина в отделах мозга самок крыс при метиониновой нагрузке. В различных отделах головного мозга при однократной метиониновой нагрузке происходит повышение уровня ГЦ (рис. 1). Показано, что в норме у молодых половозрелых самок крыс, до введения метионина, содержание ГЦ в мозжечке и гиппокампе выше его уровня в коре и гипоталамусе. При этом значимое повышение уровня ГЦ отмечено в трех исследованных отделах. Так в гиппокампе максимальный подъем ГЦ показан через 6 ч. после введения метионина, тогда как в коре и гипоталамусе — через 3 ч. При этом через 24 ч содержание ГЦ в них не отличается от значения данного показателя до введения метионина. Таким образом показано, что выбранная схема введения метионина уже с первого дня приводит к повышению содержания ГЦ в данных структурах мозга, что предполагает также подобное его повышение во все последую-

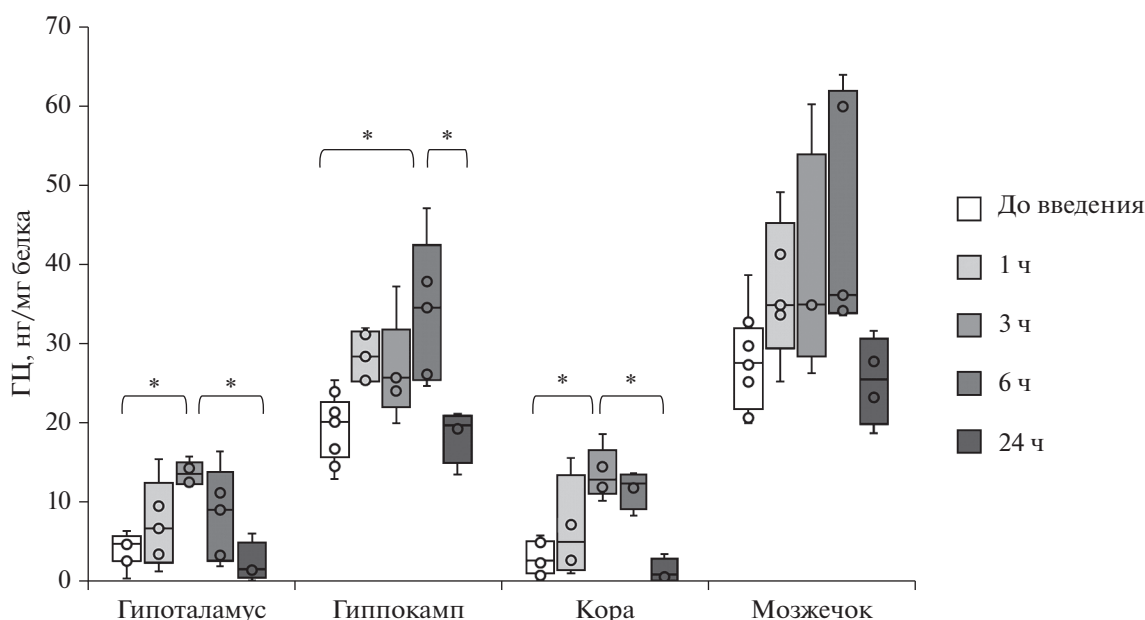


Рис. 1. Суточная динамика изменения ГЦ в различных отделах мозга самок крыс после однократного введения метионина на 4-й день беременности ($n = 4-8$ в каждой исследованной группе). Данные представлены как Медианы, 25-, 75-ая перцентиль, минимальное и максимальное значение. * $p < 0.05$.

щие дни беременности, при ежедневном введении метионина каждые 24 ч. В мозжечке, наблюдаются значительные индивидуальные различия в характере изменения содержания ГЦ при введении метионина, на что указывает высокий уровень межквартильных интервалов данного показателя в исследуемые временные периоды, в связи с чем, время максимального подъема уровня ГЦ в мозжечке после метиониновой нагрузки не было установлено.

Изменение содержания нейротрофинов в структурах мозга при ГЦ. При анализе содержания BDNF во фракции растворимых белков тканей мозга методом иммуноблотинга у взрослых животных были выявлены 3 изоформы BDNF (39, 29 и 14 кДа) (рис. 2а). Анализ содержания нейротрофинов в различных отделах мозга самок крыс на 20-ый день беременности показал, что в коре и гипоталамусе на фоне экспериментальной ГЦ снижается содержание изоформы BDNF с молекулярной массой 14 кДа, что соответствует его зрелой форме (рис. 2б, в). В коре также отмечено снижение содержание его про-формы 29 кДа. При этом в гиппокампе и мозжечке содержание различных изоформ BDNF у беременных самок крыс при ГЦ не отличалось от их уровня у контрольных беременных животных (рис. 2в, д). Под влиянием ГЦ уровень NGF не изменялся ни в одной из исследованных областей мозга беременных самок крыс (рис. 3).

Изменение содержания DNMT1 в отдельных отделах мозга при ГЦ. У животных при ГЦ было обнаружено повышение содержания DNMT1 в

растворимой фракции коры, гипоталамуса и мозжечка по сравнению с контрольными животными. При этом в гиппокампе оно значимо не отличалось в группе контрольных животных с нормальной физиологической беременностью без ГЦ, и в группе беременных самок с ГЦ (рис. 4).

Окислительная модификация белков в коре и гиппокампе мозга беременных самок крыс при ГЦ. Анализ белков с применением метода OxyBlot™ Protein Oxidation Detection показал увеличение степени окислительной модификации белков в растворимой фракции коры мозга самок крыс с ГЦ на 20-й день беременности по сравнению с контрольными беременными самками ($p < 0.05$). При этом содержание продуктов окислительной модификации белков в гиппокампе у животных, находящихся на хронической метиониновой нагрузке, значимо не отличалось от его уровня в гиппокампе контрольных животных, и повышение данного показателя носило лишь характер тенденции (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нейротрофины являются регуляторами функции нейронов в развивающемся и взрослом мозге и, таким образом, играют важную роль в развитии и поддержании его нормального функционирования. Наиболее изученным нейтрофином является BDNF. Полученные нами данные свидетельствуют, что в норме содержание BDNF во фракции легко растворимых белков гиппокампа крыс выше, чем в коре, что согласуется с данными, полученными

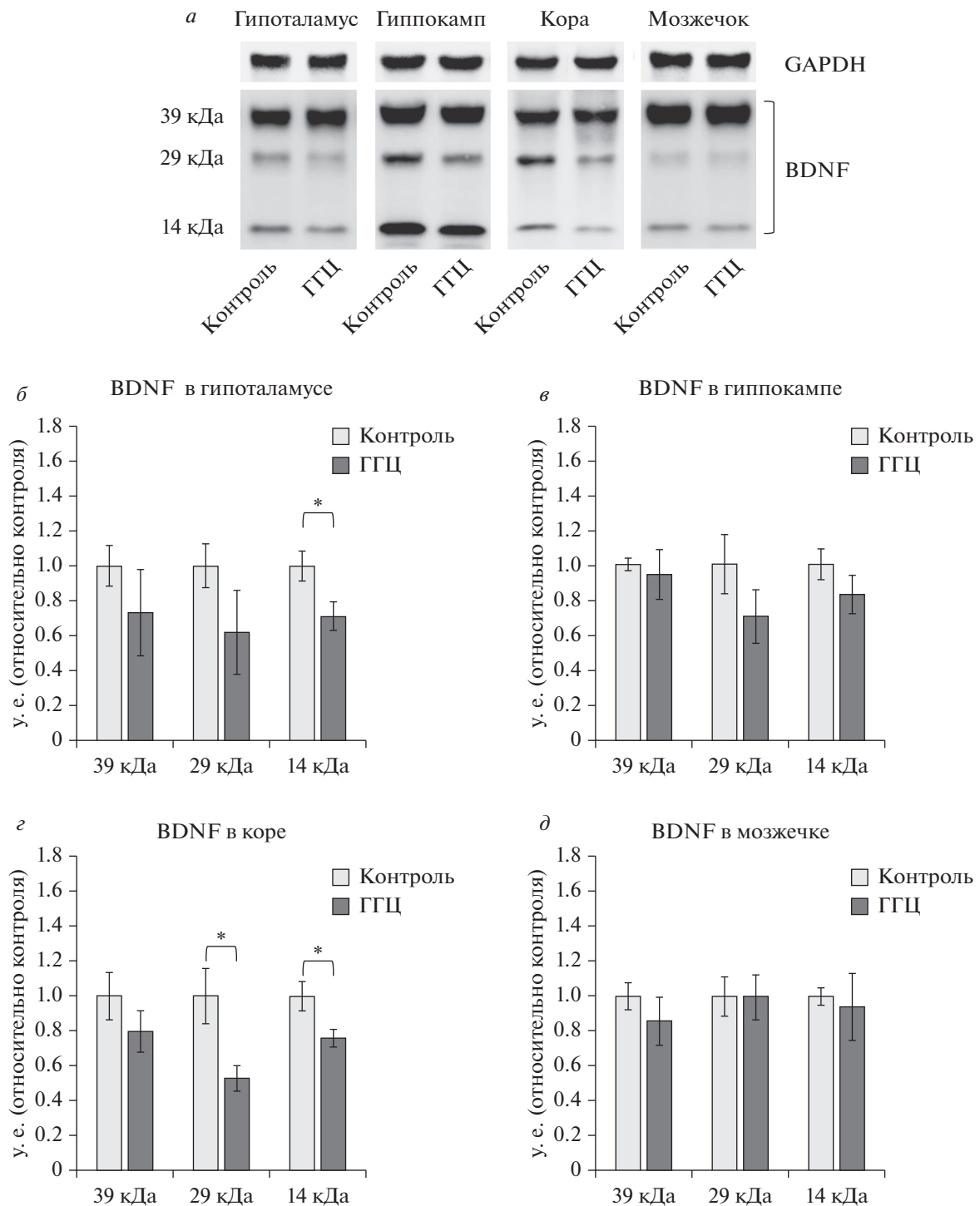


Рис. 2. Содержание различных изоформ BDNF в мозге беременных самок крыс на 20-й день беременности в норме и при ГГЦ. *a* – репрезентативный иммуноблоттинг содержания трех изоформ BDNF в различных отделах мозга самок крыс на 20-й день беременности; данные денситометрии содержания BDNF в гипоталамусе (*б*), гиппокампе (*в*), коре (*г*) и мозжечке (*д*) беременных самок крыс. Значения содержания изоформ в каждой структуре мозга в группе животных с ГГЦ, соответственно, нормализованы к их содержанию в контрольной группе самок с нормальной беременностью. Данные представлены как $M \pm SEM$, ($n = 6$ в каждой группе). * $p < 0.05$ достоверные различия значения показателя в группе беременных самок с ГГЦ и группе контроля.

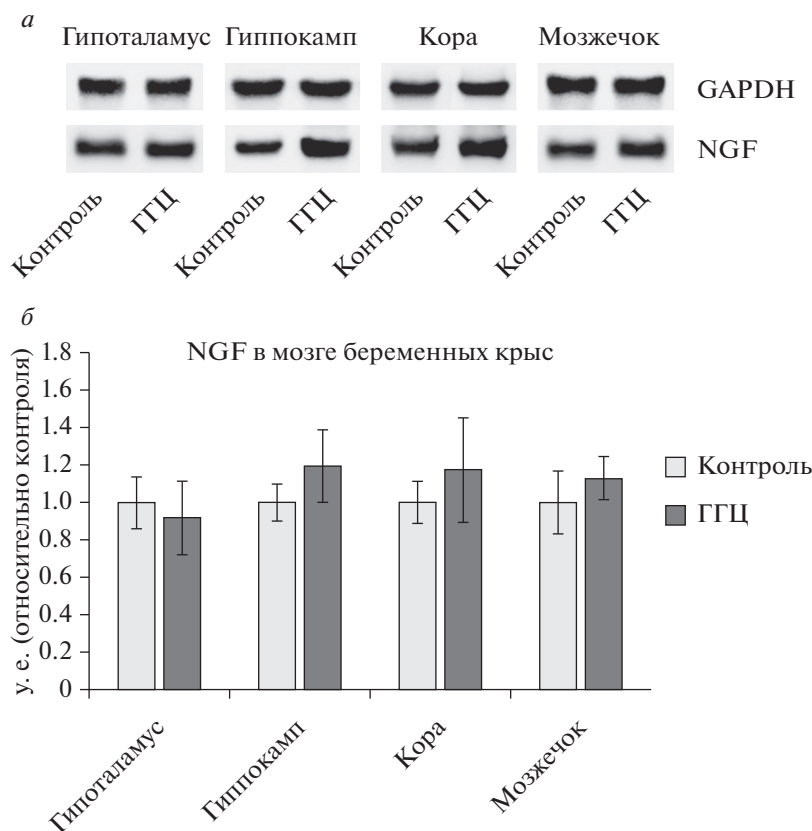


Рис. 3. Содержание NGF в мозге беременных самок крыс на 20-й день беременности в норме и при ГГЦ. *а* – репрезентативный иммуноблоттинг содержания NGF в различных отделах мозга самок крыс на 20-й день беременности; *б* – данные денситометрии о влиянии ГГЦ на содержание NGF в гипоталамусе, гиппокампе, коре и мозжечке беременных самок крыс. Значения содержания NGF в каждой структуре мозга в группе животных с ГГЦ соответственно нормализованы к его содержанию в контрольной группе самок с нормальной беременностью. Данные представлены как $M \pm SEM$, ($n = 6$ в каждой группе).

ми на мышах [11]. В связи с тем, что одним из основных, наблюдаемых эффектов воздействия ГГЦ, является когнитивная дисфункция, кора и гиппокамп преимущественно являются основными объектами изучения нейротрофинов [32]. Имеются данные о том, что введение ГЦ в течение 7 дней вызывало снижение экспрессии BDNF в гиппокампе крыс и увеличивало количество TUNEL-позитивных нейронов в области CA1. При этом увеличение эндогенной продукции H_2S и экспрессии BDNF значительно понижало индуцированный ГЦ апоптоз нейронов и стресс-реакцию эндоплазматического ретикулума (ER) в гиппокампе [33]. Внутри-мозговая инъекция ГЦ вызывала повышенную экспрессию рецепторов NMDA и их мРНК, а также снижала экспрессию белка BDNF и мРНК BDNF в гиппокампе мышей, при этом было показано, что ГЦ приводит к ремоделированию синапсов в гиппокампе [8]. В ряде исследований также показано, что у крыс с ГГЦ снижены уровни BDNF в спинномозговой жидкости и гиппокампе [7, 34], в том числе именно в модели с метиониновой нагрузкой [34]. Также было показано, что однократное

(“острое”) введение ГЦ приводит к снижению зрелой формы BDNF (mBDNF) в гиппокампе уже через 1 ч после введения, при этом, данный эффект нивелировался через 24 ч, однако изменений уровня BDNF в коре не было обнаружено ни через 1 ч, ни через 24 ч [7]. Однако некоторые расхождения в результатах, продемонстрированных в данной работе и в нашем исследовании, могут явиться следствием различий в способе выделения анализируемых белков. Ряд исследователей также отмечает, что ГГЦ, вызванная хронической метиониновой нагрузкой в течение 2–6 мес., не приводит к статистически значимому снижению BDNF в коре [9]. Однако в проведенном нами исследовании показано, что у беременных крыс происходит снижение содержания изоформы BDNF с молекулярной массой 14 кДа, соответствующей mBDNF в коре и гипоталамусе, при этом, в отличие от других исследователей, мы не обнаружили значимого изменения содержания ни одной из изоформ BDNF в гиппокампе и мозжечке. Необходимо отметить, что представленные ранее экспериментальные работы были выполнены

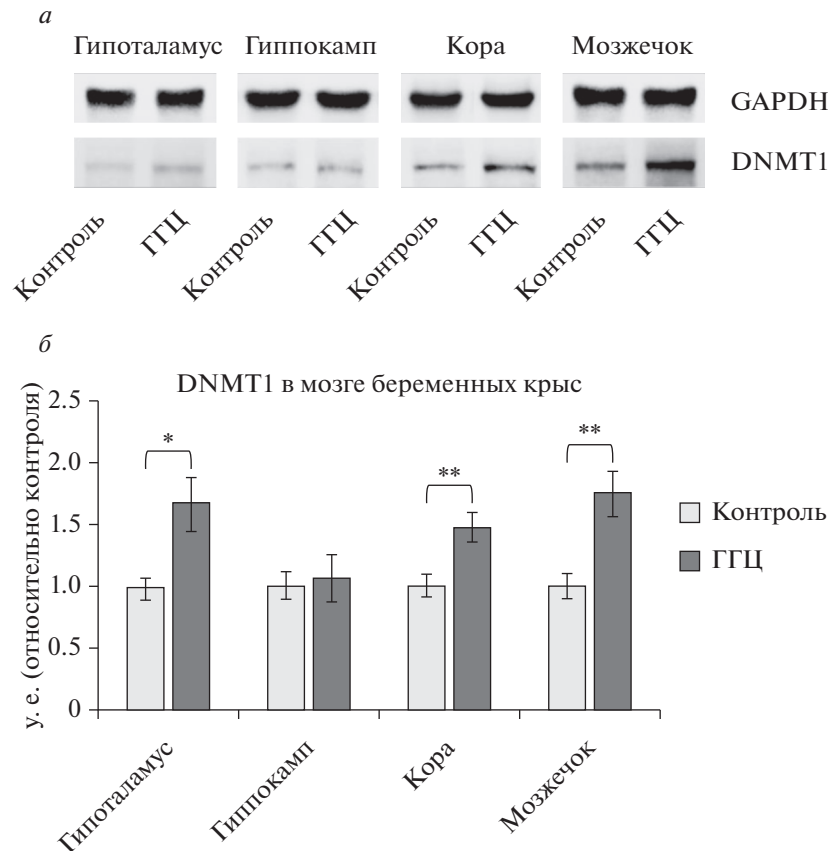


Рис. 4. Содержание DNMT1 в мозге беременных самок крыс на 20-й день беременности в норме и при ГГЦ. *a* – репрезентативный иммуноблот содержания DNMT1 в различных отделах мозга самок крыс на 20-й день беременности; *б* – влияние ГГЦ на содержание DNMT1 в гипоталамусе, гиппокампе, коре и мозжечке беременных самок крыс. Значения DNMT1 в каждой структуре мозга в группе животных с ГГЦ соответственно нормализованы по его содержанию в контрольной группе самок с нормальной беременностью без ГГЦ. Данные представлены как $M \pm SEM$, ($n = 6$ в каждой группе). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ – достоверные различия между группой беременных самок с ГГЦ и контролем.

преимущественно на самцах, либо небеременных самках. В связи с этим, нельзя исключить, что отсутствие изменений уровня BDNF в гиппокампе беременных самок крыс при ГГЦ, полученное в нашем исследовании, по сравнению с его снижением, отмеченном во множестве других работ, выполненных на небеременных самках, может быть обусловлено тем что, что организм при беременности способен адаптивно обеспечить защиту от неблагоприятного воздействия ГГЦ. Подобное заключение было также сделано другими исследователями при сравнении эффектов иммобилизационного стресса на индукцию апоптоза нейронов гиппокампа у небеременных и беременных самок крыс [35], что в совокупности с полученными нами результатами может косвенно свидетельствовать об усилении нейропластичности при беременности.

В проведенном нами исследовании метиониновая нагрузка беременных самок крыс в течение 16 дней не приводила к изменению уровня NGF ни в одной из исследованных структур. В данном случае, NGF, определяемый как изоформа 30 кДа,

соответствует его про-форме. Другими исследователями также показано, что только длительное введение ГЦ, в течение 15 мес., приводит к повышению уровня NGF в коре мозга крыс, при этом даже 5-месячное введение ГЦ не сопровождается изменением данного показателя [36]. Интерес представляет тот факт, что, как показано нами в предыдущих исследованиях, у самок крыс на 20-ый день беременности под влиянием экспериментальной ГГЦ в плаценте повышаются уровни proBDNF и proNGF, что, как мы предполагали связано с повышением экспрессии их генов и с возможным нарушением процессинга до зрелых форм [37]. Установлено, что proBDNF и mBDNF оказывают различное влияние на выживание и функционирование нейронов. В отличие от mBDNF, proBDNF специфически связывается с рецептором p75 нейротрофинов (p75NTR), активация которого приводит к снижению пролиферации нейронов и усилению процессов апоптоза [38]. Кроме того, proBDNF оказывает негативное влияние на нейрональные механизмы, участвующие в процессах обучения и

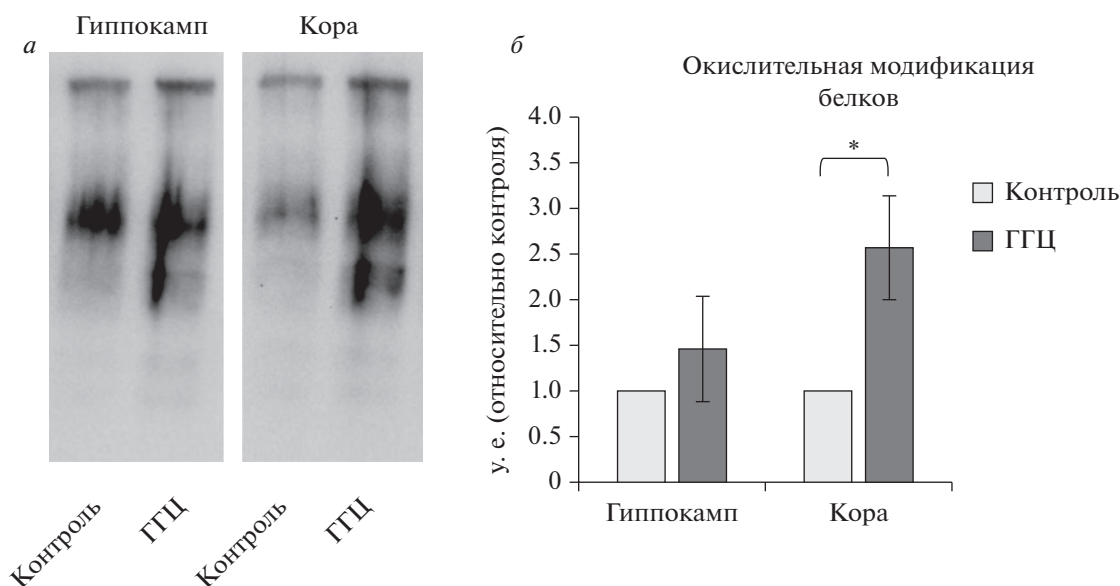


Рис. 5. Относительный уровень окислительной модификации белков (OxyBlot™) в растворимой фракции гиппокампа и коры на 20-ый день беременности в норме и при ГГЦ. *a* – репрезентативный oxyblot содержания продуктов окислительной модификации белков в гиппокампе и коре мозга самок крыс на 20-ый день беременности; *b* – количественный анализ влияния ГГЦ на содержание продуктов окислительной модификации белков в гиппокампе и коре беременных самок крыс. Значения в каждой структуре мозга в группе животных с ГГЦ соответственно нормализованы по его содержанию в контрольной группе самок с нормальной беременностью. Данные представлены как $M \pm SEM$, ($n = 4$ в каждой группе). * $p < 0.05$; – достоверные различия показателей в группе беременных самок с ГГЦ и группе контроля.

памяти, что также указывает на противоположную роль, которую он играет по сравнению с mBDNF в развитии синаптической пластичности [39].

Важность исследования изменений в гипоталамусе при ГГЦ беременных обусловлена тем, что гормоны гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, являющиеся критическим компонентом системы стресса, оказывают метаболическое/гомеостатическое действие практически на все системы организма, способствуют восстановлению после стресса и важны для реализации нормальных когнитивных и психологических функций [40, 41]. При этом было показано, что повышенный уровень ГЦ в период беременности может приводить к снижению у матерей экспрессии генов ферментов одноуглеродного метаболизма в гиппокампе потомства крыс, но не в гипоталамусе [1].

Наиболее распространенное представление о том, что в условиях ГГЦ и накопления S-аденозилгомоцистеина (SAH), а, следовательно, ингибирования большинства метилтрансфераз, наблюдается снижение как общего метилирования, так и метилирования промоторов отдельных генов, что ведет к увеличению экспрессии S-аденозилметионина (SAM), в настоящее время рассматривается уже не так однозначно. Действительно, большое количество исследований подтверждают тот факт, что ГГЦ может приводить к глобальному гипометилированию ДНК [28, 42]. ГЦ-индуцированное гипометилирование ДНК промоторных

областей гена приводит к селективной активации генов, что способствует усиленному повреждению клеток [43]. Эти результаты отчасти подтверждаются в исследованиях на культурах клеток. Так в отдельных исследованиях было показано, что изменение концентрации SAH и соотношения SAH/SAM при воздействии ГЦ может приводить к снижению активности и экспрессии белков ДНК-метилтрансфераз (DNMT) в нейрональных стволовых клетках [44], при этом в других работах получены противоположные данные, свидетельствующие об увеличении содержания DNMT1 [45], активирующей метилирование полуметилированных сайтов CpG. Необходимо отметить, что в растворимой фракции белков гиппокампа, в отсутствие изменений содержания нейротрофинов, не происходит также и изменения содержания DNMT1. Несмотря на то, что данные других исследований указывают на то, что гиппокамп наиболее восприимчив к окислительному стрессу (ОС), тогда как кора является более устойчивой структурой [15, 46], в нашей работе при ГГЦ в гиппокампе не обнаружены признаки развития ОС, в отличие от коры, в которой на фоне ГГЦ уровень окислительной модификации белков повышается более чем в 2 раза, по сравнению с контролем. Однако, повышение уровня ГЦ после введения метионина отмечено в обеих этих структурах. Изменение содержания и активности метилтрансфераз в цитоплазматической (растворимой) фракции различных отделов мозга, вероятно, зависит от на-

копления в них самого ГЦ и его метаболитов. Имеются сведения о распределении SAM в различных отделах головного мозга, в том числе, рассматриваемых в нашем исследовании. Так показано, что в норме, содержание SAM в них имеет значительные различия. При этом наибольшее его количество обнаружено в коре и гиппокампе и существенно ниже в мозжечке и гипоталамусе [47]. При этом авторы отмечают, что при гипофизэктомии в различных структурах мозга уровень SAM претерпевает разнонаправленные изменения, а в некоторых, не изменяется вообще. Эти результаты свидетельствуют о том, что в различных отделах мозга представлено разнообразие факторов, регулирующих уровни SAM *in vivo*. На основании наших данных подобное заключение справедливо и в отношении уровня и скорости метаболизма ГЦ. Мы также выявили значительные отличия в уровне ГЦ в различных отделах мозга. Кроме того, при введении метионина, динамика его изменения в гипоталамусе и коре отличалась от гиппокампа, тогда как наличие существенных индивидуальных особенностей метаболизма метионина у отдельных животных не позволило вообще достоверно определить единое время максимального подъема ГЦ в мозжечке. Ранее, мы уже отмечали, что как у молодых половозрелых, так и у беременных самок крыс, метиониновая нагрузка уже через час приводит к повышению уровня ГЦ в сыворотке крови [37, 48]. Максимальная концентрация ГЦ у большинства животных достигается через 3, либо 6 ч после введения. При этом через 24 ч его уровень значительно снижается, но сохраняется повышенным относительно уровня до введения метионина только у небеременных самок, что указывает на более активный метаболизм ГЦ при беременности [37, 48]. Известно, что метионин способен проникать через гематоэнцефалический барьер [49–51]. В мозге его оптимальный уровень отмечается уже через 15–30 мин после инъекции [52]. Транспорт ГЦ, образующегося при метаболизме метионина, опосредован различными транспортными системами клеток [53, 54]. Он имеет общие транспортеры с другими нейтральными аминокислотами [53, 55], что предполагает возможность его транспорта через гематоэнцефалический барьер. В связи с этим, благодаря интенсивному транспорту метионина и ГЦ в исследуемые структуры мозга, непосредственно в них может быть реализован нейротрофический эффект как самого ГЦ, так и его метаболитов. Для выяснения вопроса о том, является ли повышение содержания ГЦ в ткани мозга при ГГЦ результатом повышения его транспорта или он синтезируется из поступающего в мозг метионина, потребуются дополнительные исследования.

Эффективный гидролиз SAM S-аденозилгомоцистеингидролазой (SAHN) необходим для поддержания реакций метилирования. Показано, что

SAHN взаимодействует с DNMT1 и усиливает ее функциональный статус в клетках млекопитающих [56]. Кроме того, SAHN контролирует циркадную экспрессию генов, взаимодействуя с основным активатором транскрипции CLOCK и BMAL1. У мышей ингибирование SAHN в гипоталамусе изменяет циркадную двигательную активность и ритмическую транскрипцию в супрахиазматическом ядре [57]. При этом циркадианные ритмы, в частности катехоламинов, в структурах гипоталамуса половозрелых самок крыс, связанных с регуляцией репродуктивной функции, могут нарушаться при ГГЦ [58]. В связи с этим, данные о повышении ГЦ в гипоталамусе, а также снижении mBDNF и увеличении содержания DNMT1 в его цитозольной фракции необходимо учитывать при анализе эффектов влияния ГГЦ на функции, находящиеся под контролем гипоталамической регуляции.

В настоящее время большое внимание уделяется изучению процессов метилирования нейротрофических факторов, в частности, BDNF при действии неблагоприятных факторов на организм в период беременности. Это позволяет на основании экспериментальных данных рассматривать изменение уровня ДНК-метилирования BDNF в различных отделах мозга в качестве биомаркера нарушений в раннем онтогенезе потомства [59, 60]. Важным результатом проведенного нами исследования является также тот факт, что несмотря на то, что в гиппокампе при метиониновой нагрузке беременных крыс, а также в коре и в гипоталамусе наблюдается повышение уровня ГЦ, значимых эффектов хронической ГГЦ в период беременности в данной структуре на уровне исследованных показателей не обнаружено. При этом в коре на фоне ГГЦ происходит снижение уровня mBDNF и про-формы BDNF 29 кДа, повышение содержания DNMT1 и увеличение продуктов окислительной модификации во фракции растворимых белков, указывающих на развитие ОС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, при ГГЦ во время беременности динамика изменения ГЦ при метиониновой нагрузке, а также содержание нейротрофинов и DNMT1 во фракции растворимых белков претерпевают различные изменения в разных структурах мозга. При этом в гиппокампе изменений в содержании нейротрофинов и DNMT1 не обнаружено. Эти результаты свидетельствуют о том, что в различных отделах мозга действуют разные системы, регулирующие уровень ГЦ и его метаболитов *in vivo*, которые могут существенно изменяться с наступлением беременности. Подавляющее большинство исследований, посвящено изучению нейротрофического воздействия неблагоприятных факторов, в том числе ГГЦ, на плод и новорожденного. Однако, накапливается множество

экспериментальных и клинических фактов, доказывающих, что эпигенетические модификации при беременности вызывают метаболические изменения в структурах мозга, сопровождающиеся нейрорепатологическими процессами [61], которые могут способствовать развитию депрессивных состояний и сказываться на здоровье матери [62]. Это делает исследования влияния ГГЦ на мозг во время беременности особенно актуальными и своевременными.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ 18-015-00099-а и Госзадания 1021062812133-0-3.2.2.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ngai Y.F., Sulistyoningrum D.C., O'Neill R., Innis S.M., Weinberg J., Devlin A.M. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015. V. 309. № 5. P. R613–622.
2. Shcherbitskaia A.D., Vasilev D.S., Milyutina Y.P., Tumanova N.L., Mikhel A.V., Zalozniaia I.V., Arutjunyan A.V. // *Cells.* 2021. V. 10. № 6. P.
3. Yakovleva O., Bogatova K., Mukhtarova R., Yakovlev A., Shakhmatova V., Gerasimova E., Ziyatdinova G., Hermann A., Sitdikova G. // *Biomolecules.* 2020. V. 10. № 7. P.
4. Shcherbitskaia A.D., Vasilev D.S., Milyutina Y.P., Tumanova N.L., Zalozniaia I.V., Kerkeshko G.O., Arutjunyan A.V. // *Neurotox Res.* 2020. V. 38. № 2. P. 408–420.
5. Wang J., Ge J., Yang L., Zhang H., Li X., Xue D. // *Neural Regen Res.* 2012. V. 7. № 28. P. 2199–2205.
6. Maghsoudi N., Ghasemi R., Ghaempanah Z., Ardekani A.M., Nooshinfar E., Tahzibi A. // *Basic Clin. Neurosci.* 2014. V. 5. № 2. P. 131–137.
7. Matte C., Pereira L.O., Dos Santos T.M., Mackedanz V., Cunha A.A., Netto C.A., Wyse A.T. // *Neuroscience.* 2009. V. 163. № 4. P. 1039–1045.
8. Kamat P.K., Kyles P., Kalani A., Tyagi N. // *Mol. Neurobiol.* 2016. V. 53. № 4. P. 2451–2467.
9. de Rezende M.M., D'Almeida V. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 8. P. e105704.
10. Baloula V., Fructuoso M., Kassis N., Gueddouri D., Paul J.L., Janel N. // *Redox Biol.* 2018. V. 19. № P. 200–209.
11. Souchet B., Latour A., Gu Y., Daubigney F., Paul J.L., Delabar J.M., Janel N. // *J. Mol. Neurosci.* 2015. V. 55. № 2. P. 318–323.
12. Luo J., Tang C., Chen X., Ren Z., Qu H., Chen R., Tong Z. // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2020. V. 17. № 6.
13. Nestler E.J., Barrot M., DiLeone R.J., Eisch A.J., Gold S.J., Monteggia L.M. // *Neuron.* 2002. V. 34. № 1. P. 13–25.
14. Kang J., Wang D., Duan Y., Zhai L., Shi L., Guo F. // *Brain Sci.* 2020. V. 11. № 1.
15. Dionisie V., Ciobanu A.M., Toma V.A., Manea M.C., Baldea I., Olteanu D., Sevastre-Berghian A., Clichici S., Manea M., Riga S., Filip G.A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 14.
16. Hague W.M. // *Best Pract. Res. Clin. Obstet Gynaecol.* 2003. V. 17. № 3. P. 459–469.
17. Cotter A.M., Molloy A.M., Scott J.M., Daly S.F. // *Am. J. Obstet Gynecol.* 2003. V. 189. № 2. P. 391–394; discussion 394–396.
18. Murphy M.M. // *Biomark Med.* 2007. V. 1. № 1. P. 145–157.
19. Jakubowski H. // *Cell Mol. Life Sci.* 2004. V. 61. № 4. P. 470–487.
20. Powers R.W., Gandley R.E., Lykins D.L., Roberts J.M. // *Hypertension.* 2004. V. 44. № 3. P. 327–333.
21. Xi H., Zhang Y., Xu Y., Yang W.Y., Jiang X., Sha X., Cheng X., Wang J., Qin X., Yu J., Ji Y., Yang X., Wang H. // *Circ. Res.* 2016. V. 118. № 10. P. 1525–1539.
22. Zanin R.F., Bergamin L.S., Morrone F.B., Coutinho-Silva R., de Souza Wyse A.T., Battastini A.M. // *Purinergic Signal.* 2015. V. 11. № 4. P. 463–470.
23. Kasture V.V., Sundrani D.P., Joshi S.R. // *Life Sciences.* 2018. V. 206. P. 61–69.
24. Poddar R., Chen A., Winter L., Rajagopal S., Paul S. // *J Neurochem.* 2017. V. 142. № 4. P. 560–573.
25. Boldyrev A.A. // *Biochemistry (Mosc).* 2009. V. 74. № 6. P. 589–598.
26. Cai B., Li X., Wang Y., Liu Y., Yang F., Chen H., Yin K., Tan X., Zhu J., Pan Z., Wang B., Lu Y. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 5. P. e63561.
27. Dhobale M.V., Pisal H.R., Mehendale S.S., Joshi S.R. // *Int J Dev Neurosci.* 2013. V. 31. № 8. P. 719–723.
28. Jiang Y., Sun T., Xiong J., Cao J., Li G., Wang S. // *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2007. V. 39. № 9. P. 657–667.
29. Bradford M.M. // *Anal Biochem.* 1976. V. 72. № P. 248–254.
30. Levine R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shaltiel S., Stadtman E.R. // *Methods Enzymol.* 1990. V. 186. № P. 464–478.
31. Bass J.J., Wilkinson D.J., Rankin D., Phillips B.E., Sze-wczyk N.J., Smith K., Atherton P.J. // *Scand J Med Sci Sports.* 2017. V. 27. № 1. P. 4–25.
32. Fang M., Wang J., Yan H., Zhao Y.X., Liu X.Y. // *Mol Med Rep.* 2014. V. 10. № 5. P. 2511–2516.
33. Wei H.J., Xu J.H., Li M.H., Tang J.P., Zou W., Zhang P., Wang L., Wang C.Y., Tang X.Q. // *Acta Pharmacol Sin.* 2014. V. 35. № 6. P. 707–715.
34. Gao L., Zeng X.N., Guo H.M., Wu X.M., Chen H.J., Di R.K., Wu Y. // *Neurol Sci.* 2012. V. 33. № 1. P. 39–43.
35. Moosavi M., Ghasemi R., Maghsoudi N., Rastegar K., Zarifkar A. // *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology.* 2011. V. 158. № 2. P. 199–203.
36. Pirchl M., Ullrich C., Humpel C. // *Eur J Neurosci.* 2010. V. 32. № 9. P. 1516–1527.
37. Arutjunyan A.V., Milyutina Y.P., Shcherbitskaia A.D., Kerkeshko G.O., Zalozniaia I.V., Mikhel A.V. // *Biochemistry (Mosc).* 2020. V. 85. № 2. P. 213–223.
38. Sasi M., Vignoli B., Canossa M., Blum R. // *Pflugers Arch.* 2017. V. 469. № 5–6. P. 611.
39. Dincheva I., Lynch N.B., Lee F.S. // *Depress Anxiety.* 2016. V. 33. № 10. P. 907–916.

40. de Kloet E.R., Joels M., Holsboer F. // *Nat Rev Neurosci*. 2005. V. 6. № 6. P. 463–475.
41. Lupien S., Lecours A.R., Lussier I., Schwartz G., Nair N.P., Meaney M.J. // *J Neurosci*. 1994. V. 14. № 5 Pt 1. P. 2893–2903.
42. Yi P., Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I.P., Hine R.J., James S.J. // *J Biol Chem*. 2000. V. 275. № 38. P. 29318–29323.
43. Kim C.S., Kim Y.R., Naqvi A., Kumar S., Hoffman T.A., Jung S.B., Kumar A., Jeon B.H., McNamara D.M., Irani K. // *Cardiovasc Res*. 2011. V. 92. № 3. P. 466–475.
44. Lin N., Qin S., Luo S., Cui S., Huang G., Zhang X. // *FEBS J*. 2014. V. 281. № 8. P. 2088–2096.
45. Jia S.J., Lai Y.Q., Zhao M., Gong T., Zhang B.K. // *Pharmazie*. 2013. V. 68. № 4. P. 282–286.
46. Salim S. // *J. Pharmacol. Exp. Ther*. 2017. V. 360. № 1. P. 201–205.
47. Wong D.L., Zager E.L., Ciaranello R.D. // *J. Neurosci*. 1982. V. 2. № 6. P. 758–764.
48. Arutyunyan A.V., Milyutina Y.P., Zaloznyaya I.V., Pustygina A.V., Kozina L.S., Korenevskii A.V. // *Neurochemical Journal*. 2012. V. 6. № 1. P. 71–76.
49. Young S.N., Shalchi M. // *J. Psychiatry Neurosci*. 2005. V. 30. № 1. P. 44–48.
50. He W., Wu G. // *Adv. Exp. Med. Biol*. 2020. V. 1265. № P. 167–185.
51. Wu G. // *Amino Acids: Biochemistry and Nutrition*, 2021. 816 p.
52. Streck E.L., Vieira P.S., Wannmacher C.M., Dutra-Filho C.S., Wajner M., Wyse A.T. // *Metab. Brain Dis*. 2003. V. 18. № 2. P. 147–154.
53. Jiang X., Yang F., Brailoiu E., Jakubowski H., Dun N.J., Schafer A.I., Yang X., Durante W., Wang H. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2007. V. 27. № 9. P. 1976–1983.
54. Tsitsiou E., Sibley C.P., D'Souza S.W., Catanescu O., Jacobsen D.W., Glazier J.D. // *J. Inherit. Metab. Dis*. 2011. V. 34. № 1. P. 57–65.
55. Budy B., O'Neill R., DiBello P.M., Sengupta S., Jacobsen D.W. // *Arch. Biochem. Biophys*. 2006. V. 446. № 2. P. 119–130.
56. Ponnaluri V.K.C., Esteve P.O., Ruse C.I., Pradhan S. // *J. Mol. Biol*. 2018. V. 430. № 14. P. 2051–2065.
57. Greco C.M., Cervantes M., Fustin J.M., Ito K., Ceglia N., Samad M., Shi J., Koronowski K.B., Forne I., Ranjit S., Gaucher J., Kinouchi K., Kojima R., Gratton E., Li W., Baldi P., Imhof A., Okamura H., Sassone-Corsi P. // *Sci. Adv*. 2020. V. 6. № 51. P. eabc5629
58. Korenevskii A.V., Arutyunyan A.V., Milyutina Y.P., Zaloznyaya I.V., Kozina L.S. // *Neurochemical Journal*. 2014. V. 8. № 3. P. 205–207.
59. Kundakovic M., Gudsnuk K., Herbstman J.B., Tang D., Perera F.P., Champagne F.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2015. V. 112. № 22. P. 6807–6813.
60. Kertes D.A., Bhatt S.S., Kamin H.S., Hughes D.A., Rodney N.C., Mulligan C.J. // *Clin. Epigenetics*. 2017. V. 9. P. 68.
61. Mandaviya P.R., Stolk L., Heil S.G. // *Mol. Genet. Metab*. 2014. V. 113. № 4. P. 243–252.
62. Cattane N., Raikkonen K., Anniverno R., Mencacci C., Riva M.A., Pariante C.M., Cattaneo A. // *Mol. Psychiatry*. 2021. V. 26. № 2. P. 482.

The Effect of Hyperhomocysteinemia on the Content of Neurotrophins in Brain Structures of Pregnant Rats

Yu. P. Milyutina^{a, b}, A. V. Arutjunyan^a, A. D. Shcherbitskaia^{a, c}, and I. V. Zalozniaia^a

^a D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russia

^b St. Petersburg State Paediatric Medical University of the Ministry of Healthcare of Russia, St. Petersburg, Russia

^c Federal State Budgetary Institution of Science I.M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

Maternal hyperhomocysteinemia (HHC) during pregnancy was shown to lead to disruption of fetal nervous system development and cause long-term consequences, including cognitive dysfunction, in postnatal life. Impairment of methylation processes and the development of oxidative stress (OS) are among the major mechanisms of neurotoxic effects of homocysteine and its metabolites. A change in the level of neurotrophins in the hippocampus of adult males is one of the established consequences of exposure to HHC in the adult body. This study presents the results of the effect of HHC on the content of neurotrophins in various brain structures (hippocampus, hypothalamus, cerebral cortex, cerebellum) of rats on the 20th day of pregnancy. Daily dynamics of homocysteine content in these brain structures after single methionine loading was analyzed on the 4th day of pregnancy. Although there were no changes in the levels of the pro-forms of the nerve growth factor (NGF) and brain neurotrophic factor (BDNF), there was a decrease in the content of the mature form of BDNF and an increase in the level of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) both in the cerebral cortex and in the hypothalamus. At the same time, an increased level of the products of oxidative modification of proteins was noted in the cortex. No significant changes in the studied parameters were found in the hippocampus, which indicates its resistance to the toxic effect of HHC during pregnancy. Thus, a pathologic effect of HHC is manifested in the cortex and hypothalamus, which can lead to the development of anxiety-depressive states and negatively affect the health of the pregnant female and, accordingly, the developing fetus.

Keywords: brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, DNA methyltransferase, oxidative stress, hypothalamus, hippocampus, pregnancy

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ**

УДК 577.175.44,618.3,57.041,577.2

**ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ И ТРАНСПЛАЦЕНТАРНОГО
ПЕРЕНОСА ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ В СИСТЕМЕ “МАТЬ-ПЛОД”
ПРИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ**© 2022 г. А. Д. Щербицкая^{1, 2, *}, А. А. Коваленко¹, Ю. П. Милютина², Д. С. Васильев¹¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия² Научно-исследовательский институт акушерства,
гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 16.03.2022 г.

После доработки 25.03.2022 г.

Принята к публикации 26.03.2022 г.

Накопление в организме матери аминокислоты гомоцистеина — гипергомоцистеинемия — отмечается при несоблюдении сбалансированного питания во время беременности, недостатке некоторых витаминов и генетических дефектах ферментов метионинового цикла. При этом повышается риск развития микротромбозов в плаценте, а у потомства наблюдается отставание развития ткани головного мозга, гибель нейронов и глиоз, приводящие к нарушению когнитивных функций. Проведено исследование тиреоид-зависимой системы регуляции развития мозга плода при хронической пренатальной гипергомоцистеинемии, вызванной дозированной метиониновой нагрузкой у самок крыс. Анализировали содержание тироксина и трийодтиронина в крови беременных самок, содержание их переносчика транстиретина, экспрессии рецепторов (TR- α , TR- β), трансмембранных переносчиков (Oatp1c1, Mct8) и дейодиназ (Dio2, Dio3) в ткани плаценты и мозга плода. Несмотря на отсутствие заметных нарушений снабжения плода тиреоидными гормонами со стороны матери, было обнаружено негативное влияние гипергомоцистеинемии на уровень экспрессии Dio3, Oatp1c1 и Mct8 в нервной ткани плода на E14, а также снижение экспрессии TR- α и повышение Dio3 в плаценте в конце беременности. Подобный эффект высокого уровня гомоцистеина на функциональное состояние плаценты и на чувствительность развивающегося мозга у потомства к трофическому действию тиреоидных гормонов может являться причиной отставания в процессе развития нервной ткани плода.

Ключевые слова: гипергомоцистеинемия, тиреоидные гормоны, тироксин, трийодтиронин, плацента, эмбриогенез, мозг плода, крыса, TR- α , TR- β , Oatp1c1, Mct8, Dio2, Dio3

DOI: 10.31857/S1027813322030104

ВВЕДЕНИЕ

Отставание развития головного мозга является неспецифической реакцией плода на любое стрессовое воздействие во внутриутробном периоде [1]. В частности, отставание развития структуры и функций головного мозга было отмечено при наиболее частых видах воздействий на систему “мать-плод”: гипоксического [2, 3] и токсического [4, 5]. Вместе с тем механизмы отставания в развитии недостаточно изучены. Есть основания полагать, что одна из причин задержки развития плода может быть связана с нарушением трофической и/или гормональной регуляции роста плода со стороны организма матери [6].

Хорошо известно, что тиреоидные гормоны, тироксин (Т4) и трийодтиронин (Т3), играют важную роль в регуляции общего развития и формирования головного мозга в раннем онтогенезе [7, 8]. В частности, известно об их влиянии на процессы миграции нейробластов [9], дифференцировки нейронов [10] и глиальных элементов [11, 12]. Помимо прямого влияния тиреоидных гормонов на экспрессию целого ряда генов, необходимых для нормального формирования нервной ткани, возможно опосредованное влияние через модуляцию продукции нейротрофических факторов [13–15]. В период эмбриогенеза тиреоидные гормоны попадают в плод через плаценту, и их недостаточное поступление из организма матери может приводить к серьезным патологиям развития плода, в первую очередь его головного мозга [16]. Известно, что, начиная с 3-го дня после имплантации эмбриона крысы и до созревания его

* Адресат для корреспонденции: 194223 Россия, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44; тел. 552-31-66; e-mail: nastusiq@gmail.com.

собственной системы синтеза тиреоидных гормонов, стимуляция развития головного мозга этими гормонами полностью зависит от снабжения со стороны организма матери. На поздних стадиях эмбриогенеза роль собственной продукции тиреоидных гормонов эмбрионом возрастает, однако зависимость от материнского T4 остается до самого рождения [17]. Установлено, что даже в случае достаточного уровня собственного синтеза гормонов плодом, гипотиреоз матери может вызвать нарушение нормального формирования ЦНС [18]. Вместе с тем, состояние системы собственного синтеза гормонов плодом на поздней стадии эмбриогенеза крайне важно для обеспечения нормальной экспрессии нейрональных генов в клетках кортикальных отделов мозга [19].

Врожденный гипотиреоз достаточно часто встречается в клинической практике и бывает вызван либо сниженной продукцией тиреоидных гормонов, либо нарушением их действия на уровне клетки. Так, под влиянием тиреотоксических препаратов, принимаемых во время беременности (большие дозы йода, соли лития, бромиды, Мерказолил, некоторые транквилизаторы), может развиться патология щитовидной железы. Другими распространенными факторами ее развития являются аутоиммунный тиреоидит у беременных, влияние внутриутробных инфекций, а также токсических и химических веществ [20, 21]. Влияние внешних факторов среды и стрессоров признается не менее важным, однако изучено значительно слабее, чем действие медико-биологических факторов. В 15% случаев причиной врожденного гипотиреоза является недостаточный синтез тиреоидных гормонов или тканевых рецепторов к ним [22]. Встречается врожденный гипотиреоз вследствие генетически обусловленных дефектов (выработка аномального тиреотропного гормона и тиреолиберина), либо внутриутробной аномалии гипоталамо-гипофизарной системы. Возможна пожизненная инвалидизация больного, если диагноз “врожденный гипотиреоз” устанавливался слишком поздно. Распространенными симптомами врожденного гипотиреоза у детей являются вялость, утомляемость и задержка физиологического развития. Сходное отставание физиологического развития (вес, сроки открытия глаз и отделения наружного уха от кожи головы), формирования двигательных реакций и нарушения когнитивных функций наблюдались и в раннем онтогенезе крысят, перенесших пренатальную гипоксию [3] и гипергомостистеинемию (ГГЦ) [4, 5], что позволяет рассматривать дефицит тиреоидных гормонов как одну из потенциальных причин патологии развития мозга потомства при действии неблагоприятного фактора на систему “мать-плод” в период беременности.

Пренатальная ГГЦ связана с накоплением в организме матери аминокислоты гомоцистеина

(ГЦ). Она отмечается при несоблюдении сбалансированного питания во время беременности, недостатке некоторых витаминов [23, 24] и генетических дефектах ферментов метионинового цикла [25, 26]. У потомства наблюдается отставание развития мозга, гибель нейронов и глиоз в кортикальных отделах [27, 28]. При избытке ГЦ повышается риск развития тромбозов, в том числе в плаценте. Изменение микроциркуляции приводит к целому ряду акушерских осложнений, включая развитие гипоксии плода и хронической фетоплацентарной недостаточности, и, как следствие, к рождению детей с низкой массой тела и развитию целого ряда нарушений в период раннего онтогенеза [29]. Известно, что гипоксическое воздействие, как в перинатальный [30], так и постнатальный период [31] влияет на регуляцию тиреоид-опосредованного сигналинга. Развитие гипоксии плода, либо оксидативного стресса вследствие действия ГЦ [32] позволяет предполагать возможность нарушения тиреоид-опосредованных механизмов регуляции развития головного мозга при пренатальной ГГЦ. Данные о влиянии ГЦ на функции тиреоидной системы скудны и отрывочны [33]. В литературе, посвященной модели пренатальной ГГЦ на грызунах, практически отсутствуют данные о регуляции выработки тиреоидных гормонов и их трансплацентарного переноса в системе “мать-плод”. Действие ГЦ на молекулярные механизмы, регулирующие онтогенетическое развитие мозга плода изучено слабо. Необходимость экспериментальной проверки гипотезы о возможности развития раннего гипотиреоза под влиянием пренатальной ГГЦ определила тематику данного исследования тиреоид-зависимой системы регуляции развития мозга у крыс при хронической ГГЦ в период беременности. В рамках настоящего исследования впервые рассматривались динамика содержания тиреоидных гормонов в организме матери и плода, уровень их основного переносчика транстиретина (ТТР) в плаценте, экспрессия рецепторов (TR- α , TR- β), трансмембранных переносчиков (Oatp1c1, Mct8) и дейодиназ (Dio2, Dio3). Нарушение регуляции каждого из этих элементов способно вызывать изменения всей системы тиреоид-зависимой модуляции развития ЦНС. Высокая социальная значимость и распространенность заболеваний ЦНС, связанных с дефицитом тиреоидных гормонов определяет необходимость проведения такого исследования.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. Работа проводилась на беременных самках крыс линии Вистар (5–6 мес.), которые были разделены на 2 группы (по 15–19 животных). Первая группа состояла из животных, находившихся на стандартном рационе, и их плодов, взятых на 14-й и 20-й день пренатального разви-

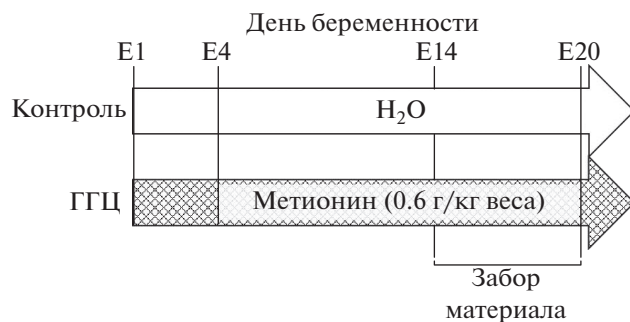


Рис. 1. Схема моделирования гипергомоцистеинемии (ГГЦ) матери. E1 – 1-й день беременности, E5 – 5-й день беременности, E14 – 14-й день беременности, E20 – 20-й день беременности.

тия (E14 и E20 соответственно). Вторую группу составили самки крыс, получавшие метиониновую нагрузку на фоне стандартного рациона, и их плоды на те же дни развития.

При проведении работ использовали разработанный ранее метод моделирования ГГЦ, основанный на дозированной метиониновой нагрузке, создаваемой путем принудительного перорального введения экспериментальным животным водного раствора L-метионина (0.6 г на кг веса животного), ежедневно, начиная с четвертого дня после оплодотворения и до родоразрешения [34, 35]. Самкам крыс контрольной группы в эти же сроки дополнительно перорально вводили воду (рис. 1). На E14 и E20 у самок крыс забирали кровь, у плодов – кровь, цельный мозг, плаценту и амниотическую жидкость. На различные сроки беременности в сыворотке крови самок и их плодов на E20, а также мозге плодов и амниотической жидкости были определены уровни тиреоидных гормонов. В плаценте проводился анализ содержания белка ТТР. В мозге плода и частях плаценты исследовали уровень экспрессии генов рецепторов к тиреоидным гормонам *TR-α* и *TR-β*, переносчиков *Oatp1c1*, *Mct8*, дейодиназ *Dio2* и *Dio3*.

Тиреолибериновый тест. Для исследования влияния хронической ГГЦ крыс в период беременности на уровень гормонов щитовидной железы в сыворотке крови в условиях стимуляции тиреолиберинемии тиреоидной оси моделирование состояния ГГЦ у беременных самок проводили как описано выше. Через 1 ч после введения метионина или воды животным из каждой группы интраназально вводили тиреолиберин в дозе 300 мкг/кг в 20 мкл физиологического раствора [36] на E5, E14 и E20 (рис. 2). Через 3 ч после введения метионина или воды, когда уровень ГЦ в сыворотке крови достигает пиковых значений [35], и через 2 ч после введения тиреолиберина у самок забирали кровь из десны [37]. Для контроля фоновых значений уровней тиреоидных гормо-

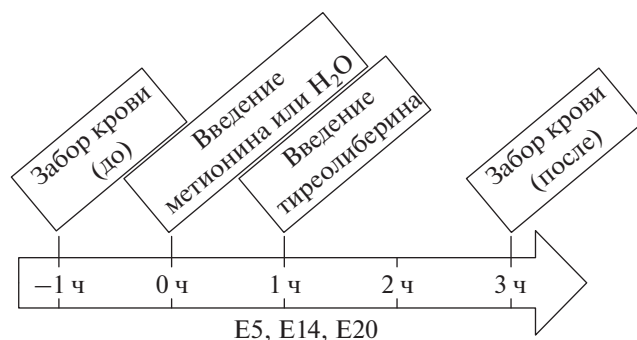


Рис. 2. Схема эксперимента с тиреолиберинемией. E5 – 5-й день беременности, E14 – 14-й день беременности, E20 – 20-й день беременности.

нов у самок также забирали кровь до введения тиреолиберина. Объем выборок составлял от 6 до 8 особей.

Иммуноферментный анализ. Сравнительное исследование уровней общего трийодтиронина (ТЗобщ), свободной фракции трийодтиронина (ТЗсв), общего тироксина (Т4общ) и свободной фракции тироксина (Т4св) в сыворотке крови, амниотической жидкости и мозге плода проводили методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов реагентов (Вектор-Бест, Россия). В качестве проб мозга плода брали супернатант, полученный путем центрифугирования (16000 g, 20 мин, +4°C) гомогената нервной ткани, приготовленного в 0.01 М PBS.

ПЦР в реальном времени. Для анализа экспрессии генов в мозге плода и плаценте использовали метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ртПЦР). Объем выборок составлял от 7 до 10 особей. Плаценту предварительно отмывали от крови в 0.01 М PBS и делили на материнскую (МЧП) и плодную (ПЧП). Выделение тотальной РНК производилось с использованием реагента ExtractRNA (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя с модификациями. Концентрацию РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Обратную транскрипцию образцов проводили с использованием oligo dT праймера и обратной транскриптазы MMLV RT (Promega, Madison, WI, USA) по протоколу производителя. Для количественной ПЦР в реальном времени готовили реакционную смесь, содержащую 0.8 мкл образца кДНК, 0.75 ед. TaqM-полимеразы (Алкор-Био, Санкт-Петербург, Россия), 200 нМ специфических прямых и обратных праймеров, 100 нМ (200 нМ для Actb) зонды TaqMan, 3.5 mM MgCl₂ и 250 мкМ dATP/dTTP/dCTP/dGTP в 10 мкл общего объема 1× TaqM-реакционного буфера. Для детекции накопления ПЦР-продукта использовали специфические флуоресцентные зонды по типу линейно-разрушаемых проб (технология TaqMan). В

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров и зондов

Ген	Прямой праймер (5' → 3') Обратный праймер (5' → 3') Зонд (5' → 3')	Температура отжига праймеров, °C
<i>Dio2</i> NM_031720.5	CGTCATCCTCAAGTGTCCCC TGGTACGCGCACATACCTT HEX-ACGTGCGACAGTGAAGCGGA-BHQ2	62
<i>Dio3</i> NM_017210.4	GCCCCGTTGGTGCTCAATTTT GGTGGGCTTCCTCGATGTAG ROX-ACCTGACCACCGTTTCATGGCGCGGA-BHQ2	60
<i>TR-α</i> NM_031134.2	TGAGCACTACGTCAACCACC CTCTGCACTTCTCTCTCCTTCA FAM-TCCGCACTTCTGGCCCAAGC-BHQ1	62
<i>TR-β</i> NM_012672.3	CCTTAGTCTGCTGGAGGACG AGCTCTGGCATTCCCTTATTCA ROX-2CGCGTGGTGGTACCAAGTTCCA-BHQ2	62
<i>Oatp1c1</i> NM_053441.1	CATGTGTGGGGACAATGGGA CCCATCATGCCTGACCAGTT FAM-TGCGTTCGGCTTGTCTTGTGGCTGT-BHQ1	60
<i>Mct8</i> NM_147216.2	TACCGTATCTGGGCCTTTGG AGCACCCAGGTTTCCTTGAT HEX-CGCTGCTGCTGCCCTTGGTTACTTCGT-BHQ2	60
<i>Ywhaz</i> NM_013011	GATGAAGCCATTGCTGAACCTTG GTCTCCTTGGGTATCCGATGTC ROX-TGAAGAGTCGTACAAAGACAGCACGC-BHQ2	60
<i>Pgk1</i> NM_053291	ATGCAAAGACTGGCCAAGCTAC AGCCACAGCCTCAGCATATTTT HEX-TGCTGGCTGGATGGGCTTGGA-BHQ2	60

эксперименте использовали флуорофоры FAM, ROX и HEX, гасители флуоресценции BHQ-1 и BHQ-2. Последовательности праймеров и зондов представлены в табл. 1. Амплификацию проводили на приборе CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, США). Все пробы анализировали двукратно. Регистрацию флуоресценции производили на окончании этапа отжига праймеров. Полученные результаты анализировали в программе REAL-TIME PCR методом пороговой линии. Для определения относительного количества мРНК в исследуемых образцах, полученные значения C_t для генов интереса нормировали по среднему геометрическому значению C_t двух генов “домашнего хозяйства” фосфоглицераткиназы (*Pgk1*) и 14-3-3z (*Ywhaz*) с использованием $2^{-\Delta\Delta C_t}$ метода [38].

Вестерн-блот анализ. Для определения уровня ТТР методом Вестерн-блот ткани плаценты, полученные на E14 и E20, предварительно отмывали от крови в 0.001M PBS. Гомогенаты ткани готовили в лизирующем буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7.4), 150 мМ NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.01% SigmaFast protease inhibitor cocktail (Sigma, S8830-20TAV) и далее центрифугировали (16000 g, 20 мин, +4°C). Содержание белка в супернатанте

определяли по методу Бредфорда. Электрофорез белков проводили в 15%-м полиакриламидном геле, загружая по 70 мкг белка на лунку [39]. После электрофореза белки переносили на PVDF мембрану, которую блокировали в 0.1%-м Tween20 на фосфатном буфере, содержащем 5% сухого молока, и инкубировали с первичными моноклональными антителами LS-B2607-50 (Life Bioscience) в разведении 1 : 1000. В качестве белка сравнения использовали β-актин, выявляемый первичными антителами (A5060, Sigma, 1 : 1000). Далее мембраны инкубировали с HRP-конъюгированными вторичными антителами против IgG мыши (Abcam, разведение 1 : 4000) или кролика (Abcam, разведение 1 : 5000). Визуализацию фракций белков осуществляли при помощи BioRad Chemidoc Touch (BioRad, USA) с использованием набора реагентов Optiblot ECL Ultra Detect Kit (1.2pg-2ng) (Abcam, ab133409). Денситометрический анализ проводили в программе ImageLab (BioRad, USA), при этом определяли величину отношения оптической плотности полос ТТР (16 кДа) к оптической плотности β-актина (45 кДа). Сопоставление контрольной ($n = 9$) и ГГЦ ($n = 9$) групп проводили по полученным отношениям.

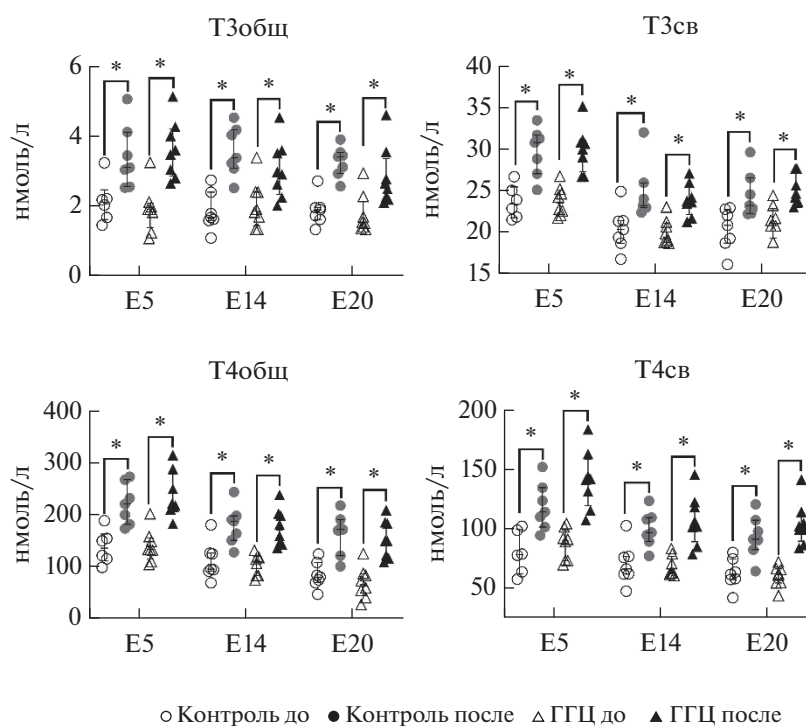


Рис. 3. Уровни общего и свободного трийодтиронина (Т3общ и Т3св), общего и свободного тироксина (Т4общ и Т4св) до и через 2 ч после введения тиреолиберина в контрольной группе ($n = 6-7$) самок крыс и в группе с гипергомоцистеинемией (ГГЦ, $n = 8$) на различные сроки беременности. E5 – 5-й день беременности, E14 – 14-й день беременности, E20 – 20-й день беременности. Данные представлены в виде Me [25%, 75%] (Me – медиана, 25% и 75% – 1-й и 3-й квартили). * Отличие значений до и после введения тиреолиберина (Wilcoxon test, $p \leq 0.05$).

Статистическая обработка данных производилась с использованием программы “Statistica 10”. Результаты обрабатывались с использованием H-критерия Крускала-Уоллиса и U-критерия Манна-Уитни. Данные были проверены на однородность дисперсий с помощью критерия Левена, нормальность распределения оценивалась критерием Шапиро-Уилка. Для анализа зависимых переменных применяли T-критерий Вилкоксона. Для оценки тесноты связей между показателями применялся коэффициент корреляции Кендалла. Данные в тексте и на рисунках представлены в виде Me [25%, 75%] (Me – медиана, 25% и 75% – 1-й и 3-й квартили). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0.05. В данном исследовании использовался двойной слепой метод. Исследователи, осуществлявшие измерения и анализ данных, не знали, к какой группе принадлежали исследуемые животные, поскольку не участвовали в назначении экспериментальных групп. Расчет оптимального размера выборок проводился на основе заранее проведенного пилотного эксперимента с использованием программы (<http://www.openepi.com/SampleSize/SSPropor.htm>).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тиреолиберинный тест используется в мировой практике как функциональный тест на состояние тиреоидной системы. При этом введение тиреолиберина (тиреотропин-релизинг-гормон), являющегося одним из представителей класса релизинг-гормонов гипоталамуса, вызывает усиление секреции передней долей гипофиза тиреотропного гормона, который в свою очередь оказывает стимулирующее влияние на выработку гормонов щитовидной железы (тироксина и трийодтиронина). В нашем эксперименте уровень Т3св и Т4св, а также Т3общ и Т4общ закономерно повышался (Wilcoxon test, $p \leq 0.05$) у самок крыс после введения тиреолиберина на E5, E14 и E20 (рис. 3). При этом стимулирующий эффект тиреолиберина на содержание тиреоидных гормонов у беременных самок с ГГЦ не отличался от такового у контрольной группы. Однако стоит отметить тот факт, что величина подъема Т3общ на E14 у крыс с хронической ГГЦ был значимо меньше (Mann-Whitney U Test, $p \leq 0.01$), чем у самок контрольной группы, но к E20 возвращался к нормальным значениям.

Внутригрупповое исследование показало, что концентрация Т3св после введения тиреолибери-

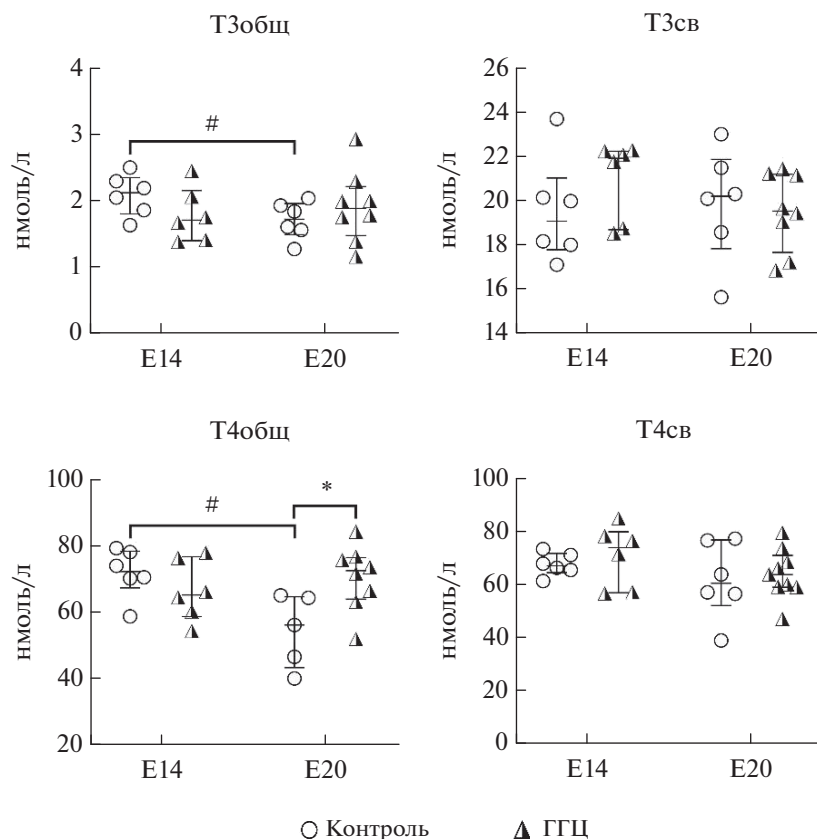


Рис. 4. Содержание гормонов щитовидной железы в сыворотке крови самок крыс контрольной группы ($n = 5-6$) и в группе с гипергомоцистеинемией (ГГЦ, $n = 6-8$) на различные сроки беременности. E14 – 14-й день беременности, E20 – 20-й день беременности. Данные представлены в виде Me [25%, 75%] (Me – медиана, 25% и 75% – 1-й и 3-й квартили). * Отличие контрольных значений от группы ГГЦ (Mann-Whitney U Test, $p \leq 0.05$); # отличие содержания гормона с течением беременности (Mann-Whitney U Test, $p \leq 0.05$).

на снижается (Kruskal-Wallis test, $p \leq 0.05$) с течением беременности в контрольной группе крыс, а также у самок с хронической ГГЦ (Kruskal-Wallis test, $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$). Сходные изменения были обнаружены при анализе содержания T4св у самок крыс, которым в течение беременности вводили раствор метионина, после стимуляции тиреолиберинном (Kruskal-Wallis test, $p \leq 0.05$). Нами было показано снижение от E5 до E20 уровня T4общ у контрольных крыс при взятии крови до введения тиреолиберина (Kruskal-Wallis test, $p \leq 0.05$), при этом анализ не выявил достоверных отличий в концентрации гормона у данных крыс после стимуляции тиреоидной оси. Уменьшение концентрации T4общ в течение беременности было установлено в сыворотке крови самок крыс из группы с ГГЦ до и после введения им тиреолиберина (Kruskal-Wallis test, $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$, $p \leq 0.001$).

В рамках настоящего исследования было впервые проведено сравнительное исследование уровней T3общ, T3св, T4общ и T4св в сыворотке крови крыс на различные сроки беременности (рис. 4) и у их плодов на E20 (рис. 5). Установлено, что ГГЦ

не приводила к изменению содержания T3общ и T3св, а также уровня T4св в сыворотке крови самок крыс ни на E14, ни на E20. При этом, в данном эксперименте было отмечено снижение (Mann-Whitney U Test, $p \leq 0.05$) концентрации T3общ с течением беременности у контрольных самок, тогда как в группе с ГГЦ такой динамики не наблюдалось. Сходные отличия также были обнаружены при исследовании уровня T4общ у контрольной группы самок (Mann-Whitney U Test, $p \leq 0.05$). Показано также, что хроническая ГГЦ привела к повышению уровня T4общ в сыворотке крови самок крыс к E20 (Mann-Whitney U Test, $p \leq 0.05$). Исследование уровня гормонов щитовидной железы в сыворотке крови плодов на E20 значимых изменений не выявило (рис. 5).

Проведенный анализ взаимосвязей с помощью Тау-критерия Кендалла выявил отрицательную связь между уровнем T3общ в сыворотке крови матери и плода из контрольной группы ($\tau = -0.8$ при $p \leq 0.05$), тогда как в группе с ГГЦ расчет ранговых коэффициентов корреляции Кендалла

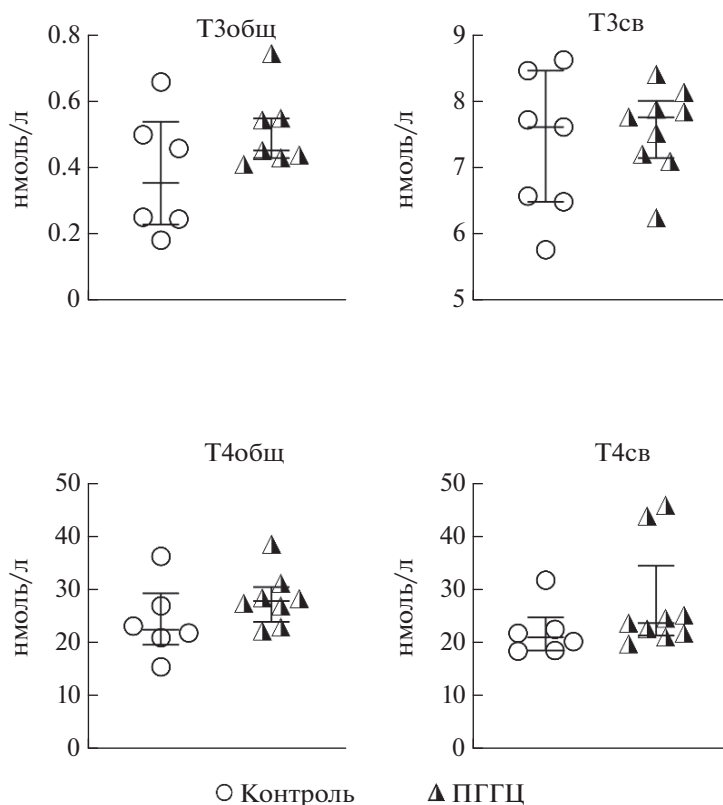


Рис. 5. Содержание тиреоидных гормонов в сыворотке крови плодов крыс контрольной группы ($n = 6-7$) и в группе с пренатальной гипергомоцистеинемией (ПГГЦ, $n = 7-9$) на 20-й день внутриутробного развития (E20). Данные представлены в виде Me [25%, 75%] (Me – медиана, 25% и 75% – 1-й и 3-й квартили).

позволил установить наличие положительной ассоциации между концентрацией T3общ у матери и ее плода ($\tau = 0.619$ при $p \leq 0.05$).

Исследование уровней тиреоидных гормонов было также проведено в мозге (рис. 6) и амниотических жидкостях (рис. 7) эмбрионов и плодов крыс на E14 и на E20. Показано, что хроническая ГГЦ матери во время беременности не приводила к изменению содержания тиреоидных гормонов в данных тканях (Kruskal-Wallis test), что согласуется с результатами, полученными при анализе этих маркеров в сыворотке крови плодов. Несмотря на то, что в нашем эксперименте не было обнаружено различий в уровнях T3 и T4 в амниотических жидкостях контрольных плодов и развивавшихся в условиях ГГЦ матери, были получены данные о динамике изменения концентрации данных гормонов в процессе внутриутробного развития (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$). Так, нами было показано, что уровни T3общ и T3св, а также T4св возрастают в амниотической жидкости в процессе развития плода, в то время как концентрация T4общ на E20 снижается и становится ниже порога детектирования, что может быть связано с пределом чувствительности тест-системы.

Результаты анализа уровня экспрессии генов интереса в мозге плодов крыс, ПЧП и МЧП на E14 и E20 представлены в табл. 2. В ходе исследования было выявлено, что у плодов крыс преобладает экспрессия *TR- α* . В мозге продукция мРНК *TR- α* оставалась неизменной на E14 и на E20. Однако в обеих частях плаценты на E20 экспрессия этого гена была значительно снижена при ГГЦ (Mann-Whitney U Test, $p \leq 0.01$). В то же время экспрессия *TR- β* не менялась в мозге плода и плаценте. Было выявлено, что в мозге плода на E20 и ПЧП ген *Dio2* практически не экспрессируется, а в МЧП его экспрессия при ГГЦ остается на уровне контроля. В мозге плодов, развивающихся в условиях ГГЦ матери, нами показано снижение экспрессии гена дейодиназы *Dio3* (Mann-Whitney U-test, $p \leq 0.05$), осуществляющей инактивацию тиреоидных гормонов, а также гена *Oatp1c1* (Mann-Whitney U-test, $p \leq 0.05$) и *Mct8* (Mann-Whitney U-test, $p \leq 0.05$). Напротив, в МЧП нами было отмечено повышение экспрессии *Dio3* как на E14, так и на E20.

В данной работе нами было впервые проведено исследование содержания ТТР в плаценте при нормальном протекании беременности и в условиях повышенного уровня ГЦ в организме мате-

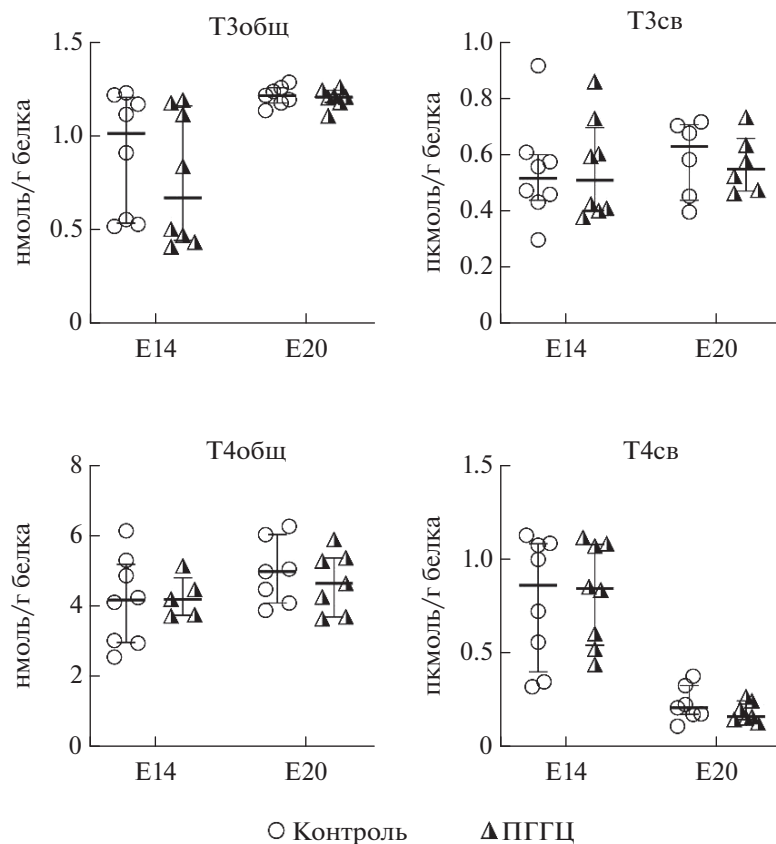


Рис. 6. Содержание тиреоидных гормонов в мозге плодов крыс на 14-й и 20-й день внутриутробного развития (E14 и E20 соответственно) в контрольной группе ($n = 6-8$) и при пренатальной гипергомоцистеинемии (ПГГЦ, $n = 5-8$). Данные представлены в виде Me [25%, 75%] (Me – медиана, 25% и 75% – 1-й и 3-й квартили).

ри (рис. 8). Проведенный анализ не выявил различий в уровне ТТР в ткани плаценты между контрольной и экспериментальной (ГГЦ) группами ни на E14 (Mann-Whitney test U-test), ни на E20 (Mann-Whitney test U-test).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно лишь небольшое число работ, посвященных изучению возможного влияния ГГЦ во время беременности на состояние тиреоидной системы матери и плода как у человека, так и на животных моделях. Зачастую в научной литературе рассматривается вопрос об эффектах гипо- или гипертиреоза на обмен ГЦ в организме. Так, некоторые клинические исследования показывают, что у пациентов с гипотиреозом концентрация T3св и T4св негативно коррелирует в уровнем ГЦ [40, 41] ввиду пониженной активности фермента 5,10-метилтетрагидрофолатредуктазы (MTHFR), что, вероятно, связано с влиянием гормонов щитовидной железы на доступность ФМН и ФАД [42]. У пациентов с тиреотоксикозом сообщается о положительной связи уровня T4св и ГЦ [43]. Повышение концентрации T4св вместе с ГЦ также

наблюдалось у беременных женщин и новорожденных детей [33], что по данным авторов было опосредовано эффектами тиреоидных гормонов на уровни фолиевой кислоты и витамина B₁₂. Исследования на животных показывают, что гипертиреоз приводит к более высоким концентрациям ГЦ [44, 45], и предполагается влияние гормонов щитовидной железы на активность метионинсинтазы [40], которая зависит от доступности витамина B₁₂. Вместе с этим в исследованиях, проведенных в горных регионах Китая, было обнаружено, что одновременное отклонение от нормального уровня тиреоидных гормонов и ГЦ в сыворотке крови матери увеличивает в 3 раза риск развития дефектов нервной трубки плода [46].

В связи с тем, что свидетельств возможного влияния повышенного содержания ГЦ в организме на регуляцию выработки тиреоидных гормонов в литературе недостаточно, нами было проведено исследование уровня T3 и T4 в сыворотке крови самок крыс на различные сроки беременности и в тканях их плодов. Результаты настоящего исследования подтверждают и несколько расширяют полученные другими авторами данные, которые показывают, что у крыс происходят важ-

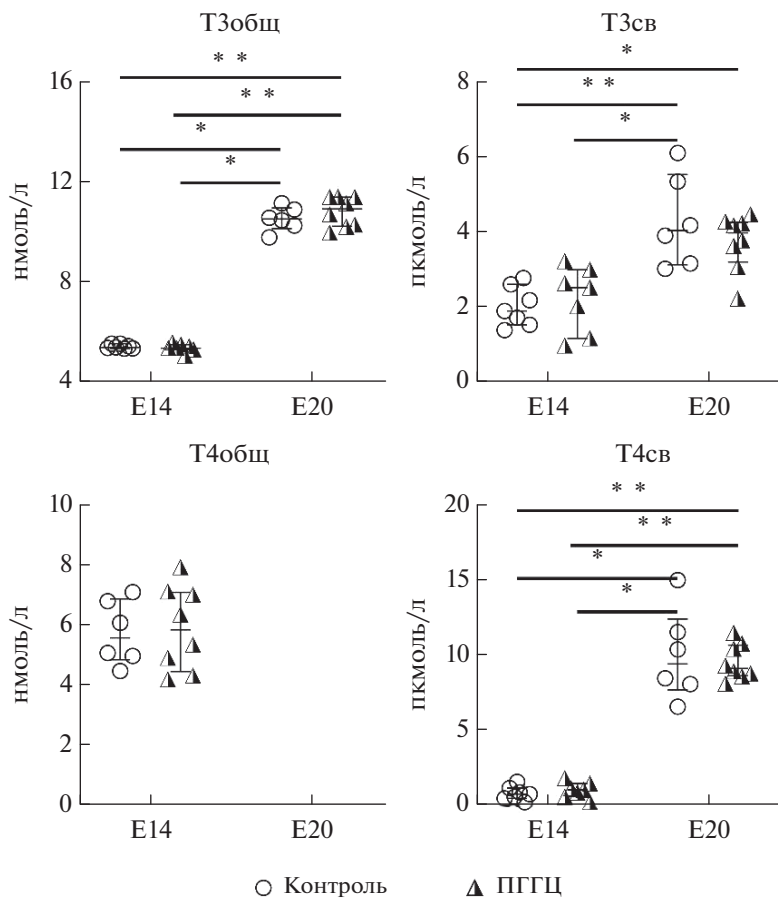


Рис. 7. Содержание гормонов щитовидной железы в амниотической жидкости плодов крыс на 14-й и 20-й день внутриутробного развития (E14 и E20, соответственно) в контрольной группе ($n = 6-7$) и при пренатальной гипергомоцистеинемии (ПГГЦ, $n = 7-8$). Данные представлены в виде Me [25%, 75%] (Me – медиана, 25% и 75% – 1-й и 3-й квартили). * Отличие значений между группами (Kruskal-Wallis test, $p \leq 0.05$); ** отличие значений между группами (Kruskal-Wallis test, $p \leq 0.01$).

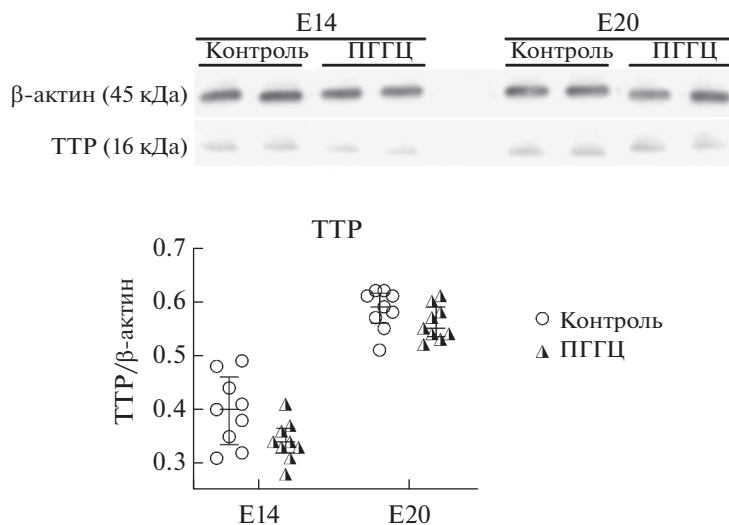


Рис. 8. Содержание транстретина (ТТР) в плаценте на 14-й (E14) и 20-й (E20) дни беременности у крыс при нормальном протекании беременности (контроль, $n = 9$) и при пренатальной гипергомоцистеинемии (ПГГЦ, $n = 9$). Данные об отношении оптической плотности ТТР к β -актину представлены в виде Me [25%, 75%] (Me – медиана, 25% и 75% – 1-й и 3-й квартили). На верхней картинке показан репрезентативный вестерн блот белка ТТР (16 кДа) и β -актина (45 кДа).

Таблица 2. Уровень экспрессии генов интереса

Ген		Мозг плода		ПЧП		МЧП	
		контроль	ПГГЦ	контроль	ПГГЦ	контроль	ПГГЦ
<i>TR-α</i>	E14	1.00 [0.81, 1.12]	0.81 [0.76, 0.86]	0.97 [0.83, 1.03]	0.96 [0.72, 1.10]	3.79 [1.18, 5.08]	4.30 [3.26, 7.22]
	E20	1.13 [0.84, 1.16]	1.10 [1.06, 1.16]	0.84 [0.80, 1.23]	0.55 [0.52, 0.58]**	0.94 [0.84, 1.00]	0.65 [0.58, 0.74]**
<i>TR-β</i>	E14	1.06 [0.80, 1.44]	1.09 [0.71, 1.43]	1.28 [0.67, 1.59]	0.90 [0.25, 1.49]	3.35 [2.51, 4.30]	4.42 [1.78, 10.08]
	E20	1.25 [0.59, 2.13]	1.04 [0.16, 2.09]	1.03 [0.74, 1.13]	1.16 [0.68, 1.27]	1.03 [0.94, 1.09]	1.10 [0.74, 1.63]
<i>Dio3</i>	E14	1.04 [0.87, 1.15]	0.69 [0.35, 0.71]*	0.86 [0.69, 1.82]	1.49 [0.82, 2.11]	0.93 [0.78, 1.39]	1.82 [1.81, 1.96]*
	E20	0.89 [0.89, 0.93]	1.03 [0.89, 1.39]	0.67 [0.62, 0.71]	0.71 [0.59, 1.13]	0.77 [0.73, 1.43]	1.96 [1.26, 2.46]*
<i>Dio2</i>	E14					2.66 [0.44, 6.08]	3.60 [2.84, 5.37]
	E20					0.96 [0.60, 1.46]	0.92 [0.60, 1.71]
<i>Oatp1c1</i>	E14	0.97 [0.84, 1.10]	0.53 [0.48, 0.72]*				
	E20	0.93 [0.86, 0.96]	1.00 [0.96, 1.11]				
<i>Mct8</i>	E14	0.95 [0.93, 1.11]	0.60 [0.42, 0.84]*				
	E20	0.99 [0.94, 1.06]	0.95 [0.90, 1.05]				

Уровень экспрессии генов *TR-α*, *TR-β*, *Dio2*, *Dio3*, *Oatp1c1* и *Mct8* в мозге плода крыс, плодной (ПЧП) и материнской части (МЧП) плаценты на 14-й и 20-й день внутриутробного развития (E14 и E20, соответственно) в контрольной группе ($n = 5-8$) и при пренатальной гипергомостеинемии (ПГГЦ, $n = 6-8$). Данные представлены в виде Me [25%, 75%] (Me – медиана, 25% и 75% – 1-й и 3-й квартили). * Отличие значений между группами (Mann-Whitney U Test, $p \leq 0.05$); ** отличие значений между группами (Mann-Whitney U Test, $p \leq 0.01$).

ные изменения уровней гормонов щитовидной железы на последних стадиях физиологической беременности. Так, было установлено, что концентрация Т4 и Т3 в плазме крыс снижается от E17 к E22 и ближе к родоразрешению составляет примерно 30% от уровня, отмечаемого у небеременных самок [47]. Мы также обнаружили снижение содержания Т3общ и Т4общ у контрольных крыс с течением беременности (от E14 к E20) в то время, как у самок с повышенным уровнем ГЦ такой динамики не наблюдалось. Полученные в ходе тиреолиберинового теста данные дают основание полагать, что хроническое введение метионина не оказывает негативного эффекта на секрецию тиреотропного гормона или на его рецептор в щитовидной железе самок крыс. Вместе с этим, обнаруженное на E20 повышение уровня Т4общ в сыворотке крови самок крыс с хрониче-

ской ГЦ может негативно влиять на функционирование не только материнского организма перед родоразрешением, но и на систему “мать-плацента-плод” в целом.

По данным литературы, в тканях плода крыс обнаруживаются небольшие количества Т4 и Т3 с 11-го дня эмбрионального развития (E11) [48]. Показано, что уровень Т4св в сыворотке плода может зависеть от концентрации Т4-связывающих белков самого плода, а также от уровня общего и свободного Т4 матери, преодолевших плацентарный барьер. При этом, исследователями было установлено, что Т4-связывающая способность белков в крови плода определяется онтогенетически, не зависит от состояния щитовидной железы матери и намного превышает то количество Т4, которое поступает к плоду [16]. Таким образом, доступность Т4св для эмбриональных

тканей в конечном итоге зависит от уровня тиреоидных гормонов в крови матери. Начало же активного функционирования щитовидной железы у плода совпадает с моментом полного созревания портальных сосудов гипофиза, которое наблюдается на E17.5–E18 у крыс (при начале беременности на E0) [16]. Далее доля тиреоидных гормонов плода в его тканях увеличивается, поэтому к моменту рождения около 17.5% фетального пула T4 [49] и 47% фетального пула T3 имеют материнское происхождение. Поэтому закономерно, что в нашем исследовании не было выявлено значимых изменений в концентрации тиреоидных гормонов в сыворотке крови плодов на E20.

Известно, что амниотическая жидкость представляет собой сложную среду, содержащую не только метаболиты плода, но питательные вещества и факторы роста, способствующие развитию плода и поступающие за счет быстрой двунаправленной диффузии между плодом и амниотической жидкостью через еще не ороговевшую кожу плода [50]. Более того, исследования на животных показали, что у плода присутствуют адаптивные и/или защитные механизмы от последствий дефицита йода, такие как поглощение йода за счет повышенной экспрессии симпортера Na-I (NIS) [51]. Таким образом, делается вывод о том, что плод может поглощать йод из амниотической жидкости для синтеза своих собственных тиреоидных гормонов [52]. Несмотря на это, работы, посвященные анализу тиреоидных гормонов в амниотической жидкости, единичны и данные в них противоречивы. Так, в одном исследовании было показано, что оценка уровня гормонов щитовидной железы в амниотической жидкости, особенно T3, может помочь в диагностике дисфункции щитовидной железы плода [53]. При этом, в более поздней работе указывается, что анализ концентрации тиреоидных гормонов и ТТГ в амниотической жидкости не дают надежного прогноза состояния щитовидной железы плода или новорожденного [54]. На животных же моделях исследования содержания данных гормонов проводятся еще реже.

Вместе с этим, исследования, посвященные изучению уровня T3 и T4 в развивающемся мозге эмбрионов и плодов крыс, как в норме, так и при патологии развития, малочисленны, а полученные в них данные ограничены, в основном, периодом, совпадающим с началом функционирования щитовидной железы плода (E17.5–E18), или следующими за ним днями (до E21) [55, 56]. У мышей T4 в мозге обнаруживается по крайней мере с E16 [57], то есть непосредственно перед началом работы щитовидной железы плода, которое у мышей отмечается примерно с E16.5 [58], при этом T3 детектируется с E18 [59]. Несмотря на то, что ГЦ матери не оказывала влияния на уровень T3 и T4 ни в амниотической жидкости, ни в мозге

плода, нами были получены новые данные об изменении содержания исследуемых гормонов в процессе роста и развития эмбрионов крыс, начиная с E14.

Известно, что белок ТТР является основным переносчиком T3 и T4 в жидких средах организма. Как было показано ранее, повышение содержания ГЦ, наблюдаемое при белково-энергетической недостаточности у людей, сопровождается снижением уровня ТТР в плазме крови [60–62]. Однако, проведенное в данной работе сопоставление содержания ТТР в плаценте на E14 и E20 при нормальном протекании беременности и в условиях повышенного уровня ГЦ в сыворотке крови матери показало отсутствие статистически значимого снижения содержания ТТР в плаценте крыс при ГЦ, что можно объяснить как межвидовыми различиями объектов исследования, так и различиями в моделировании повышения содержания ГЦ в организме.

Хотя полученные нами данные не подтверждают первоначальную гипотезу о возможном изменении уровня выработки тиреоидных гормонов в организме беременных самок крыс с ГЦ и нарушении их транспорта к плоду, следует отметить, что трофическое действие T3 и T4 на развитие головного мозга плода в условиях пренатальной ГЦ определяется не только выработкой данных гормонов в организме матери и их трансплацентарным переносом в развивающийся плод. Не менее важным фактором в данном случае является тиреоид-опосредованный сигналинг в тканях развивающегося мозга, при оценке уровня которого необходимо учитывать активность нейрональных и глиальных дейодиназ [31], внутриклеточных транспортеров (например, Mct8, [63]), экспрессию рецепторных молекул [22], что значительно усложняет задачу исследователей. Каждый из этих элементов способен вызывать нарушения всей системы тиреоид-зависимой модуляции развития ЦНС.

По литературным данным, у крыс активность Dio2 обнаруживается в мозге плода уже на E17 с ее возрастанием вплоть до дня, предшествующего рождению [64]. У мышей экспрессия мРНК *Dio2* обнаруживается в головном мозге, по крайней мере, с E15 [59], свидетельствуя, что материнские тиреоидные гормоны необходимы развивающемуся мозгу плода еще до созревания его собственной щитовидной железы. В нашем исследовании уже на E14 в мозге эмбрионов крыс была обнаружена экспрессия мРНК *Dio3*, осуществляющей инактивацию тиреоидных гормонов, и транспортеров *Oatp1c1* и *Mct8*. Что касается переносчиков тиреоидных гормонов, то на данный момент нет исследований, описывающих пространственно-временной характер их экспрессии во время эмбрионального развития ни у крыс, ни у мышей. В

мозге взрослой крысы до 80% связанного с ядерными рецепторами Т3 образуется из Т4 [65], поэтому основным источником Т3 в головном мозге является реакция локального превращения Т4 в Т3 под действием Dio2. Чтобы попасть в мозг, циркулирующие Т4 и Т3 должны преодолеть барьеры головного мозга через специфические переносчики тиреоидных гормонов. В исследованиях, посвященных анализу расположения транспортеров у грызунов, было показано, что Т3 и Т4 проникают через ГЭБ посредством Mct8 во внеклеточную жидкость, где они напрямую достигают нервных клеток вблизи кровеносных сосудов [66, 67]; и что Т4, но не Т3, проходит через ГЭБ с помощью Oatp1c1 непосредственно в астроциты, контактирующие с кровеносными сосудами [68], и уже в астроцитах Т4 за счет Dio2 превращается в Т3, который затем может транспортироваться к нейронам [69, 70]. Мозг плода же во время развития почти полностью зависит от Т3, локально генерируемого Dio2. На беременных самках с гипотиреозом было показано, что Т4, но не Т3, в физиологической концентрации может преодолевать барьеры как плаценты, так и головного мозга плода, нормализуя концентрацию Т3 в мозге плода за счет дейодирования Т4 и увеличивая экспрессию нейрональных генов [63, 71, 72]. Причина, по которой мозг плода нечувствителен к циркулирующему Т3, неизвестна и не может быть объяснена отсутствием транспортера Mct8, поскольку он экспрессируется в мозге во время внутриутробного развития плода [63]. Из вышесказанного следует исключительная важность данных о динамике экспрессии переносчиков тиреоидных гормонов и дейодиназ, при этом на модели пренатальной ГГЦ такие данные были получены впервые именно в рамках настоящей работы. Известно, что в ткани мозга Dio2 экспрессируется преимущественно в глиальных клетках. И поскольку процесс глиогенеза в рассматриваемый нами период внутриутробного развития еще не завершен, возможно, поэтому уровень экспрессии данного фермента оказывается недостаточным для его детекции. При этом, обнаруженное на E14 в мозге плодов, развивающихся в условиях ГГЦ матери, снижение экспрессии Dio3, а также Oatp1c1 и Mct8, в контексте отсутствия изменения уровней Т3 и Т4 в сыворотке крови матери и мозге плода, с одной стороны, может быть компенсаторной реакцией организма, а с другой – негативно сказываться на развитии мозга плода, в частности, за счет регуляции экспрессии Т3-зависимых генов. Так, было показано, что высокий уровень ГЦ у матери может влиять на экспрессию генов, связанных как с сетью гормонов щитовидной железы матери, так и с регуляцией зарастания нервной трубки посредством гомоцистеинилирования гистонов [46, 73]. Кроме того, у эмбрионов мышей при нарушении зарастания нервной трубки отмечено повышение

уровня ингибиторных модификаций гистонов в области промотора Dio3, при этом в тканях их матерей данных изменений обнаружено не было [74].

В то время как плод начинает вырабатывать собственные гормоны щитовидной железы только во второй половине беременности, транспорт и регуляция активности тиреоидных гормонов материнского происхождения плацентой играют важную роль в развитии и функционировании как самой плаценты, так и влияют на развитие плода на протяжении всей беременности. С самого начала гестации Т3, действуя через свои рецепторы, стимулирует выработку эстрадиола, ХГЧ и плацентарного лактогена, каждый из которых, в свою очередь, участвует в успешной адаптации матери к беременности, а также в развитии трофобласта и сосудистой сети плаценты. В плаценте человека TR- α и TR- β локализируются в ядрах клеток синцитиотрофобласта и цитотрофобласта [75]. В нашем же исследовании у крыс экспрессия данных рецепторов обнаруживалась как в МЧП, так и в ПЧП, что соответствует зонам спонгиозотрофобласта и лабиринта плаценты крысы. Полученные данные о снижении уровня мРНК TR- α в МЧП и ПЧП на E20 у крыс с повышенным уровнем ГЦ согласуются с результатами исследований влияния других токсических воздействий на мать во время беременности, например, потребление алкоголя [76].

В тканях матери и плода обнаружены три йодтиронин-дейодиназы (Dio1, Dio2, Dio3), но только Dio2 и Dio3 присутствуют и активны в плаценте [77]. Плацентарные дейодиназы регулируют доступность тиреоидных гормонов для клеток плаценты и крови плода. Предполагается, что, в частности, Dio3 играет ключевую роль в защите плода от чрезмерных концентраций гормонов щитовидной железы матери путем превращения Т4 и Т3 в их неактивные формы [78, 79]. При ограниченном потреблении питательных веществ в плацентах овец, у которых была зафиксирована задержка внутриутробного роста плода, в конце беременности отмечено повышение экспрессии мРНК Dio3 [80]. Стоит отметить, что ранее при моделировании пренатальной ГГЦ мы также наблюдали снижение массы тела и мозга плода на E20 [34], а в данной работе нами было отмечено увеличение экспрессии мРНК Dio3 в МЧП. Это, наряду со снижением экспрессии мРНК TR- α в обеих частях плаценты, весьма вероятно, можно рассматривать как компенсаторную реакцию плаценты в ответ на более высокие концентрации Т4 в материнской крови при ГГЦ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что несмотря на отсутствие заметных нару-

шений снабжения плода тиреоидными гормонами со стороны организма матери, в середине беременности (на E14) наблюдается негативное влияние ГГЦ на уровень экспрессии *Dio3*, *Oatp1c1* и *Mct8* в нервной ткани плода, регулирующих обмен тиреоидных гормонов. Подобный эффект высокого уровня ГЦ на чувствительность развивающегося мозга к трофическому действию тиреоидных гормонов может являться причиной отставания в процессе развития нервной ткани плода. Вместе с тем, ГЦ может влиять на рост плода опосредованно, то есть нарушая функциональное состояние плаценты, осуществляющей транспорт и инактивацию избыточного количества тиреоидных гормонов материнского происхождения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят А.О. Шпакова и К.В. Деркач за ценные рекомендации и продуктивную дискуссию о функционировании тиреоидной сигнальной оси у крыс в норме и при патологии онтогенетического развития. Авторы выражают благодарность Центру коллективного пользования научным оборудованием для физиологических, биохимических и молекулярно-биологических исследований (ЦКП) ИЭФБ РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (20-015-00388) и Госзадания (075-00408-21-00 и 1021062812133-0-3.2.2).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое одобрение. Все эксперименты на животных были выполнены в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации и одобрены комитетами по этике Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (протокола №3/2020 от 18.03.2020) и Научно-исследовательского института акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта (протокол №88 от 08.12.2017).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rice D., Barone S. // Environmental Health Perspectives. 2000. V. 108. № suppl. 3. P. 511–533.
- Nyakas C., Buwald B., Luiten P.G.M. // Progress in Neurobiology. 1996. V. 49. № 1. P. 1–51.
- Dubrovskaya N.M., Zhuravin I.A. // Neuroscience and Behavioral Physiology. 2009. V. 40. № 2. P. 231–238.
- Arutjunyan A., Kozina L., Stvolinskiy S., Bulygina Y., Mashkina A., Khavinson V. // Int. J. Clin. Exp. Med. 2012. V. 5. № 2. P. 179–185.
- Gerasimova E., Yakovleva O., Burkhanova G., Khaertdinov N., Sitdikova G., Ziyatdinova G. // BioNanoScience. 2017. V. 7. № 1. P. 155–158.
- Fowden A.L., Forhead A.J., Coan P.M., Burton G.J. // Journal of Neuroendocrinology. 2008. V. 20. № 4. P. 439–450.
- Alemu A., Terefe B., Abebe M., Biadgo B. // Int. J. Reprod. Biomed. 2016. V. 14. № 11. P. 677–686.
- Andersen S., Bruun N.H., Pedersen K.M., Laurberg P. // Thyroid. 2003. V. 13. № 11. P. 1069–1078.
- Martínez-Galán J.R., Pedraza P., Santacana M., Escobar del Ray F., Morreale de Escobar G., Ruiz-Marcos A. // Journal of Clinical Investigation. 1997. V. 99. № 11. P. 2701–2709.
- Enrique Silva J., Peter R. // Endocrinology. 1990. V. 126. № 2. P. 1276–1282.
- Manzano J., Bernal J., Morte B. // International Journal of Developmental Neuroscience. 2007. V. 25. № 3. P. 171–179.
- Lima F.R.S., Gervais A., Colin C., Izembart M., Neto V.M., Mallat M. // The Journal of Neuroscience. 2001. V. 21. № 6. P. 2028–2038.
- Bernal J. // Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism. 2007. V. 3. № 3. P. 249–259.
- Wu Y., Koenig R.J. // Trends in Endocrinology & Metabolism. 2000. V. 11. № 6. P. 207–211.
- Gould E., Butcher L.L. // The Journal of Neuroscience. 1989. V. 9. № 9. P. 3347–3358.
- Morreale de Escobar G., Obregon M.J., Escobar del Rey F. // European Journal of Endocrinology. 2004. P. U25–U37.
- Vulsma T., Gons M.H., de Vijlder J.J. // N. Engl. J. Med. 1989. V. 321. № 1. P. 13–16.
- Haddow J.E., Palomaki G.E., Allan W.C., Williams J.R., Knight G.J., Gagnon J., O'Heir C.E., Mitchell M.L., Hermos R.J., Waisbren S.E., Faix J.D., Klein R.Z. // N. Engl. J. Med. 1999. V. 341. № 8. P. 549–555.
- Morte B., Ceballos A., Diez D., Grijota-Martínez C., Dumitrescu A.M., Di Cosmo C., Galton V.A., Refetoff S., Bernal J. // Endocrinology. 2010. V. 151. № 5. P. 2381–2387.
- Williams F.L.R., Simpson J., Delahunty C., Ogston S.A., Bongers-Schokking J.J., Murphy N., van Toor H., Wu S.-Y., Visser T.J., Hume R. // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2004. V. 89. № 11. P. 5314–5320.
- Ares S., Quero J., Diez J., de Escobar G.M. // Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism. 2011. V. 24. № 11–12. P.
- Hashimoto K., Curty F.H., Borges P.P., Lee C.E., Abel E.D., Elmquist J.K., Cohen R.N., Wondisford F.E. // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2001. V. 98. № 7. P. 3998–4003.
- Baydas G., Koz S.T., Tuzcu M., Nedzvetsky V.S., Etem E. // Int. J. Dev. Neurosci. 2007. V. 25. № 3. P. 133–139.
- Blaise S.A., Nedelec E., Schroeder H., Alberto J.M., Bossenmeyer-Pourie C., Gueant J.L., Daval J.L. // Am. J. Pathol. 2007. V. 170. № 2. P. 667–679.
- Zhang C., Cai Y., Adachi M.T., Oshiro S., Aso T., Kaufman R.J., Kitajima S. // Journal of Biological Chemistry. 2001. V. 276. № 38. P. 35867–35874.

26. Namekata K., Enokido Y., Ishii I., Nagai Y., Harada T., Kimura H. // Journal of Biological Chemistry. 2004. V. 279. № 51. P. 52961–52969.
27. Shcherbitskaia A.D., Vasilev D.S., Milyutina Y.P., Tumanova N.L., Mikhel A.V., Zalozniaia I.V., Arutjunyan A.V. // Cells. 2021. V. 10. № 6. P. 1536.
28. Shcherbitskaia A.D., Vasilev D.S., Milyutina Y.P., Tumanova N.L., Zalozniaia I.V., Kerkeshko G.O., Arutjunyan A.V. // Neurotoxicity Research. 2020. V. 38. № 2. P. 408–420.
29. Ars C.L., Nijs I.M., Marroun H.E., Muetzel R., Schmidt M., Steenweg-de Graaff J., van der Lugt A., Jaddoe V.W., Hofman A., Steegers E.A., Verhulst F.C., Tiemeier H., White T. // British Journal of Nutrition. 2016. V. 122. № s1. P. S1–S9.
30. Pereira D.N., Procianny R.S. // Acta Paediatr. 2003. V. 92. № 3. P. 339–345.
31. Freitas B.C.G., Gereben B., Castillo M., Kalló I., Zeöld A., Egri P., Liposits Z., Zavacki A.M., Maciel R.M.B., Jo S., Singru P., Sanchez E., Lechan R.M., Bianco A.C. // Journal of Clinical Investigation. 2010. V. 120. № 6. P. 2206–2217.
32. Koz S.T., Gouwy N.T., Demir N., Nedzvetsky V.S., Etem E., Baydas G. // Int. J. Dev. Neurosci. 2010. V. 28. № 4. P. 325–329.
33. Barjaktarovic M., Steegers E.A.P., Jaddoe V.W.V., de Rijke Y.B., Visser T.J., Korevaar T.I.M., Peeters R.P. // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 2017. V. 102. № 12. P. 4548–4556.
34. Arutjunyan A.V., Milyutina Y.P., Shcherbitskaia A.D., Kerkeshko G.O., Zalozniaia I.V., Mikhel A.V. // Biochemistry (Moscow). 2020. V. 85. № 2. P. 248–259.
35. Arutyunyan A.V., Milyutina Y.P., Zaloznyaya I.V., Pustygina A.V., Kozina L.S., Korenevskii A.V. // Neurochemical Journal. 2012. V. 6. № 1. P. 71–76.
36. Derkach K.V., Shpakova E.A., Titov A.K., Shpakov A.O. // International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2015. V. 21. № 3. P. 249–260.
37. Зильфян В.Н., Кумкумаджян В.А. // Журн. Экспер. и клин. Медицины. 1970. V. 10. № 4. P. 12–14.
38. Livak K.J., Schmittgen T.D. // Methods. 2001. V. 25. № 4. P. 402–408.
39. Schägger H. // Nature Protocols. 2006. V. 1. № 1. P. 16–22.
40. Orzechowska-Pawilojc A., Sworzczak K., Lewczuk A., Babinska A. // Endocrine Journal. 2007. V. 54. № 3. P. 471–476.
41. Diekman M.J.M., Van Der Put N.M., Blom H.J., Tijssen J.G.P., Wiersinga W.M. // Clinical Endocrinology. 2001. V. 54. № 2. P. 197–204.
42. Orzechowska-Pawilojc A., Lewczuk A., Sworzczak K. // Endokrynol Pol. 2005. V. 56. № 2. P. 194–202.
43. Colleran K.M., Ratliff D.M., Burge M.R. // Endocrine Practice. 2003. V. 9. № 4. P. 290–295.
44. Jacobs R.L., Stead L.M., Brosnan M.E., Brosnan J.T. // Canadian Journal of Physiology and Pharmacology. 2000. V. 78. № 7. P. 565–570.
45. Ozkan Y., Donder E., Guney H., Baydas G. // Neuro Endocrinol Lett. 2005. V. 26. № 5. P. 536–540.
46. Gu Y.-H., Zhang Q., Guo J., Wang F., Bao Y., Qiu Z., Zheng P., Ushijima M., Matsuura M., Xie X., Zhang T. // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2021. V. 68.
47. Calvo R., Obregon M.J., De Ona C.R., Ferreiro B., Del Rey F.E., De Escobar G.M. // Endocrinology. 1990. V. 127. № 1. P. 10–16.
48. Obregon M.J., Mallol J., Pastor R., Escobar G.M.D., Rey F.E.D. // Endocrinology. 1984. V. 114. № 1. P. 305–307.
49. De Escobar G.M., Calvo R., Obregon M.J., Del Rey F.E. // Endocrinology. 1990. V. 126. № 5. P. 2765–2767.
50. Underwood M.A., Gilbert W.M., Sherman M.P. // Journal of Perinatology. 2005. V. 25. № 5. P. 341–348.
51. Obregon M.-J., de Escobar G.M., de Mena R.M., Calvo R.M., Lavado-Autric R. // Endocrinology. 2013. V. 154. № 1. P. 529–536.
52. Velasco I., Sánchez-Gila M., Manzanares S., Taylor P., García-Fuentes E. // Journal of Clinical Medicine. 2020. V. 9. № 1. P. 177.
53. Chopra I.J., Crandall B.F. // New England Journal of Medicine. 1975. V. 293. № 15. P. 740–743.
54. Hollingsworth D.R., Alexander N.M. // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 1983. V. 57. № 2. P. 349–355.
55. De Oña C.R., Obregon M.J., Del Rey F.E., De Escobar G.M. // Pediatric Research. 1988. V. 24. № 5. P. 588–594.
56. Escobar G.M.D., Pastor R., Obregon M.J., Rey F.E.D. // Endocrinology. 1985. V. 117. № 5. P. 1890–1900.
57. Dong H., You S.-H., Williams A., Wade M.G., Yauk C.L., Thomas Zoeller R. // Cerebral Cortex. 2015. V. 25. № 7. P. 1735–1745.
58. Fernández L.P., López-Márquez A., Santisteban P. // Nature Reviews Endocrinology. 2014. V. 11. № 1. P. 29–42.
59. Báñez-López S., Obregon M.J., Bernal J., Guadaño-Ferraz A. // Cerebral Cortex. 2018. V. 28. № 5. P. 1783–1793.
60. Ingenbleek Y., Kimura H. // Nutrition Reviews. 2013. V. 71. № 7. P. 413–432.
61. McCully K.S. // Ann Clin Lab Sci. 2011. V. 41. № 4. P. 301–314.
62. McCully K.S. // Comprehensive Physiology. 2015. P. 471–505.
63. Morte B., Bernal J., Morreale de Escobar G., Díez D., Grijota-Martínez C. // Endocrinology. 2011. V. 152. № 4. P. 1713–1721.
64. De Oña C.R., De Escobar G.M., Calvo R., Del Rey F.E., Obregon M.J. // Endocrinology. 1991. V. 128. № 1. P. 422–432.
65. Crantz F.R., Silva J.E., Larsen P.R. // Endocrinology. 1982. V. 110. № 2. P. 367–375.
66. Dumitrescu A.M., Liao X.-H., Weiss R.E., Millen K., Refetoff S. // Endocrinology. 2006. V. 147. № 9. P. 4036–4043.
67. Trajkovic M., Visser T.J., Mittag J., Horn S., Lukas J., Darras V.M., Raivich G., Bauer K., Heuer H. // Journal of Clinical Investigation. 2007. V. 117. № 3. P. 627–635.
68. Mayerl S., Müller J., Bauer R., Richert S., Kassmann C.M., Darras V.M., Buder K., Boelen A., Visser T.J., Heuer H. // Journal of Clinical Investigation. 2014. V. 124. № 5. P. 1987–1999.

69. *Bárez-López S., Guadaño-Ferraz A.* // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2017. V. 11. № P.
70. *Morte B., Bernal J.* // *Frontiers in Endocrinology*. 2014. V. 5. P. 82.
71. *Calvo R., Obregón M.J., Ruiz de Oña C., Escobar del Rey F., Morreale de Escobar G.* // *Journal of Clinical Investigation*. 1990. V. 86. № 3. P. 889–899.
72. *De Escobar G.M., Jesus Obregon M., De Oña C.R., Del Rey F.E.* // *Endocrinology*. 1988. V. 122. № 4. P. 1521–1531.
73. *Zhang Q., Bai B., Mei X., Wan C., Cao H., Dan L., Wang S., Zhang M., Wang Z., Wu J., Wang H., Huo J., Ding G., Zhao J., Xie Q., Wang L., Qiu Z., Zhao S., Zhang T.* // *Nature Communications*. 2018. V. 9. № 1.
74. *Li H., Bai B., Zhang Q., Bao Y., Guo J., Chen S., Miao C., Liu X., Zhang T.* // *Gene*. 2015. V. 573. № 2. P. 254–260.
75. *Knabl J., de Maiziere L., Hüttenbrenner R., Hutter S., Jückstock J., Mahner S., Kainer F., Desoye G., Jeschke U.* // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. V. 21. № 11. P. 4056.
76. *Shukla P.K., Sittig L.J., Ullmann T.M., Redei E.E.* // *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 2011. V. 35. № 3. P. 559–565.
77. *Kanellopoulos-Langevin C., Sun Y.-N., Liu Y.-J., Zhang L., Ye Y., Lin L.-X., Li Y.-M., Yan Y.-Q., Chen Z.-P.* // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 4. P. e96047.
78. *Patel J., Landers K., Li H., Mortimer R.H., Richard K.* // *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2011. V. 22. № 5. P. 164–170.
79. *Mortimer R.H., Galligan J.P., Cannell G.R., Addison R.S., Roberts M.S.* // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 1996. V. 81. № 6. P. 2247–2249.
80. *Steinhauser C.B., Askelson K., Hobbs K.C., Bazer F.W., Satterfield M.C.* // *Domestic Animal Endocrinology*. 2021. V. 77. № P. 106632.

Thyroid Hormone Production and Transplacental Transfer in the “Mother-Fetus” System during Gestational Hyperhomocysteinemia

A. D. Shcherbitskaia^{a, b}, A. A. Kovalenko^a, Yu. P. Milyutina^b, and D. S. Vasilev^a

^a *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

^b *Ott Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Medicine, St. Petersburg, Russia*

Accumulation of the amino acid homocysteine in the mother's body – hyperhomocysteinemia – is noted with an unbalanced diet during pregnancy, a lack of certain vitamins and genetic defects in the methionine cycle enzymes. This increases the risk of developing microthrombosis in the placenta, and in the offspring there is a lag in brain tissue development, neuronal death and gliosis, leading to impaired cognitive functions. A study of the thyroid-dependent system of fetal brain development regulation during chronic prenatal hyperhomocysteinemia induced by a dosed methionine load in female rats was carried out. Thyroxine and triiodothyronine levels in the blood of pregnant females, the content of their transporter transthyretin, expression of receptors (TR- α , TR- β), transmembrane transporters (Oatp1c1, Mct8) and deiodinases (Dio2, Dio3) in the tissue of the placenta and fetal brain were analyzed. The negative effect of hyperhomocysteinemia on *Dio3*, *Oatp1c1* and *Mct8* expression in the fetal nervous tissue on E14, as well as a decrease in TR- α expression and an increase in *Dio3* in the placenta at the end of pregnancy, were found despite the absence of noticeable disturbances in the thyroid hormones supply to the fetus by the mother. Such an effect of a high homocysteine level on the functional state of the placenta and on the sensitivity of the offspring developing brain to the trophic action of thyroid hormones may be the cause of the fetal nervous tissue development delay.

Keywords: hyperhomocysteinemia, thyroid hormones, thyroxine, triiodothyronine, placenta, embryogenesis, fetal brain, rat, TR- α , TR- β , Oatp1c1, Mct8, Dio2, Dio3

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ
РАБОТЫ

УДК 616.092.9

УРОВЕНЬ КАРБОНИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ И АКТИВНОСТЬ
ПРОТЕАЗ В МОЗГЕ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС С ПРЕНАТАЛЬНОЙ
ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ

© 2022 г. А. В. Яковлев¹*, С. А. Дмитриева², А. Н. Краснова¹, О. В. Яковлева¹, Г. Ф. Ситдикова¹

¹ Казанский Федеральный университет, Казань, Россия

² Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

Поступила в редакцию 10.03.2022 г.

После доработки 19.04.2022 г.

Принята к публикации 27.04.2022 г.

Гомоцистеин – серосодержащая аминокислота, образующаяся из метионина, является фактором риска развития целого ряда патологий. Повышение уровня гомоцистеина (гипергомоцистеинемия, ГГц) во время беременности приводит к различным осложнениям беременности, гипоксии плода и, как следствие, развитию ранних и отсроченных постнатальных патологий. Одним из основных механизмов действия гомоцистеина является окислительный стресс. Целью нашего исследования было проанализировать окислительную модификацию белков и активность протеаз, а также уровень окислительного стресса в ткани головного мозга крыс с пренатальной ГГц в первую неделю после рождения. Экспериментальная модель ГГц создавалась у самок крыс путем использования корма с повышенным содержанием метионина в течение 3 недель до начала и во время беременности. Было показано, что в гомогенате ткани мозга потомства с пренатальной ГГц наблюдалось усиление спонтанного карбонилирования белков, что свидетельствует о падении резервно-адаптационного потенциала клеток мозга и снижении устойчивости ткани к действию свободных радикалов. В мозге крыс с пренатальной ГГц была увеличена активность кислых и нейтральных протеаз, что, по-видимому, обусловлено агрегацией и фрагментацией белковых молекул вследствие карбонилирования аминокислотных остатков. Ткани мозга новорожденных крыс с пренатальной ГГц характеризовались высоким содержанием H_2O_2 , маркера перекисного окисления липидов – малонового диальдегида, а также снижением активности антиоксидантных ферментов. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о значительном усилении необратимого процесса окислительной модификации белков в головном мозге новорожденных крыс с пренатальной ГГц в результате развития окислительного стресса. Эти процессы вносят вклад в механизмы нейротоксичности гомоцистеина в критический период развития мозга, когда в условиях повышенной нейропластичности наблюдается интенсивный нейрогенез, синаптогенез и формирование нервных сетей.

Ключевые слова: окислительная модификация белков, пренатальная гипергомоцистеинемия, мозг, протеазы, антиоксидантные системы, перекисное окисление липидов

DOI: 10.31857/S1027813322030141

ВВЕДЕНИЕ

Мозг плода чрезвычайно пластичен и уязвим к воздействиям как окружающей, так и внутренней среды, которые могут иметь долгосрочные последствия для здоровья и развития потомства [1]. Известно, что ведущая роль в возникновении и развитии пренатального стресса принадлежит окислительным реакциям, которые приводят к увеличению концентрации активных форм кислорода (АФК) и стимуляции процессов свободно-радикального окисления [2]. Избыточная продукция АФК на ранних сроках беременности вызывает

повреждение клеточных мембран плода, что во многом определяет долговременные постнатальные изменения в головном мозге, и является одной из причин развития нейродегенеративных заболеваний [3]. Одним из факторов, вызывающих окислительный стресс в тканях плода является гомоцистеин и его продукты [4–9]. Повышение уровня гомоцистеина в крови матери свыше 12 мкм/л, называемое гипергомоцистеинемией (ГГц), является результатом генетических дефектов ферментов метаболизма метионина, дефицита фолиевой кислоты и других витаминов группы В (В6, В12), приема противосудорожных препаратов и других факторов [6, 10]. ГГц вызывает эндотелиальные дисфункции и считается факто-

* Адресат для корреспонденции: 420008 Казань, ул. Кремлевская 18, e-mail: alv.yakovlev@gmail.com.

ром риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, а также патологий центральной и периферической нервной системы, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, шизофрения, эпилепсия, боковой амиотрофический склероз и мигрень [6, 11, 12].

Гомоцистеин и продукты его метаболизма способны свободно проникать через плацентарный и гематоэнцефалический барьер [13], вызывая нарушения кровообращения плаценты, хроническую фетоплацентарную недостаточность и внутриутробную гипоксию плода [14, 15], а также оказывать нейротоксические эффекты на развивающийся мозг как в эмбриональном, так и в раннем постнатальном периоде развития. Помимо окислительного стресса нейротоксическое действие гомоцистеина обусловлено его способностью активировать ионотропные и метаболитные глутаматные рецепторы [16–20], вызывать нейровоспаление, активацию глиальных клеток, нарушение целостности мембран и, в конечном счете, апоптоз нейронов [21–25]. Эти процессы лежат в основе нарушения формирования нейрональных сетей мозга, поскольку именно в раннем постнатальном онтогенезе происходит миграция и дифференцировка нейронов, созревание синапсов [26]. Одним из последствий ГГц также является снижение активности ферментов, синтезирующих эндогенный газотрансмиттер – сероводород, который проявляет антиоксидантные свойства [8, 9], а также участвует в регуляции плацентарной сосудистой сети [27].

АФК взаимодействуют с функциональными группами аминокислот, вызывая окислительную модификацию белков (ОМБ), включающую процессы карбонилирования аминокислотных остатков, образование дисульфидов, S-нитрозилирование и окисление до сульфопроизводных продуктов и гомоцистеинилирование [28–31]. Сравнительный анализ чувствительности к окислению белков и липидов под действием АФК показал, что белки реагируют раньше на действие радикалов, чем липиды [32]. Модификация белков делает их более чувствительными к протеолизу за счет активации протеаз. Повышение активности нейтральных и кислых протеаз в различных структурах мозга было показано при окислительном стрессе [33], что, по мнению авторов, связано с усилением входа ионов кальция в клетку. С другой стороны, карбонилирование белков может приводить к образованию комплексов, защищенных от действия протеаз и снижению скорости протеолитических реакций [34].

Целью нашей работы было проанализировать окислительную модификацию белков и активность протеаз, а также уровень окислительного стресса в тканях головного мозга крыс в модели пренатальной ГГц в первую неделю после рождения.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Исследование проводили на крысах линии Wistar в течение первой недели после рождения. Эксперименты выполнены с соблюдением принципов Хельсинской декларации о гуманном обращении с животными и одобрены локальным этическим комитетом Казанского федерального университета (протокол № 8 от 05.05.2015). Были приняты меры для использования минимального количества экспериментальных животных. Животные содержались в стандартных условиях вивария и имели постоянный доступ к воде. Крысы получали стандартный комбикорм для лабораторных крыс и мышей “Дельта Фидс”, ДБК 120 С-19 (АО “БиоПро”, Новосибирская обл., Россия). Самки крыс были разделены на две группы. Одна группа находилась весь период на контрольной диете, а другая группа получала корм с повышенным содержанием метионина (7.7 г/кг корма) в течение 3 недель до начала и во время беременности, а также 3 недели после родоразрешения [8, 9, 35].

Определение содержания гомоцистеина. Забор крови у крыс проводили путем пункции сердца или надреза десны животного [36, 37]. Полученные образцы центрифугировались в течение 15 мин при 1500 g. Гомоцистеин в плазме крови крыс определялся с использованием набора Homocysteine Colorimetric Assay Kit (E-BC-K143, ElabScience, США) спектрофотометрическим методом с использованием ИФА-ридера (Multiskan FS, Thermo Fisher Scientific, США). Концентрация гомоцистеина в плазме у контрольных самок составляла 7.9 ± 0.3 мкМ ($n = 12$), а у самок, получавших метионин, – 27.3 ± 2.4 мкМ ($n = 15$, $p < 0.05$) [8, 9].

Обработка ткани мозга. Для исследований использовали мозг новорожденных крыс в возрасте от 2 до 7 дней после рождения. Ткани мозга после декапитации немедленно замораживались в жидком азоте и хранились при -80°C до начала анализа. Для измерения редокс-метаболизма ткани мозга гомогенизировали в 20 мМ HEPES (pH 7.2) (1 : 9 – масса : объем), центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин при 4°C , и супернатант использовали для анализа. Содержание общего белка оценивали прямым методом по оптической плотности 1 мкл супернатанта при длине волны 280 нм с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные значения содержания белка в мг/мл использовали для количественного выражения содержания окисленных белков и активности ферментов.

Анализ спонтанной и металл-зависимой (индуцированной) окислительной модификации белков (ОМБ). Уровень спонтанной ОМБ определяется количеством присутствующих в пробе карбонильных производных белков. Метод основан на реакции взаимодействия карбонильных произ-

водных окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием окрашенных 2,4-динитрофенилгидразонов [28]. Реакцию проводили в 100 мкл образца с добавлением 1 мл 0.01 М 2,4-ДНФГ, растворенного в 2 М HCl. Пробы инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 1 ч, затем центрифугировали в течение 15 мин при 10000 g. Полученный осадок промывали смесью этанол : этилацетат (1 : 1) для удаления липидов и 2,4-ДНФГ, не прореагировавшего с карбонильными группами окисленных белков, и растворяли в 3 мл 8 М раствора мочевины; для лучшего растворения к осадку добавляли 2 М HCl. Оценка металл-зависимой ОМБ проводилась после предварительной инкубации с реактивом Фентона, содержащем 0.4 мМ FeSO₄ и 0.1 мМ H₂O₂ в течение часа. Оптическую плотность образовавшихся производных 2,4-ДНФГ определяли при длине волны 363 нм ($\epsilon = 22 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) с помощью спектрофотометра Lambda-25 (Perkin Elmer, США). Содержание окисленных белков выражали в нг/мг белка.

Для оценки резервно-адаптационного потенциала ткани мозга использовали соотношение концентрации спонтанно окисленных к уровню металл-индуцированных карбонильных производных белков, принимая последний за 100%. Чем больше доля спонтанной ОМБ, тем меньше резервно-адаптационный потенциал исследуемого образца [26, 28].

Общую протеолитическую активность измеряли с использованием специфического протеазного субстрата – азоказеина (Sigma Aldrich, США) [38]. Для исследования активности кислых протеаз в пробирку вносили 400 мкл 1 мМ ацетатного буфера (pH 5.5), а цитоплазматических протеаз – 400 мкл 1 мМ HEPES буфера (pH 7.2). Полученные растворы смешивали с 10 мкл 0.1% раствора Triton X-100, затем в пробирку добавляли 400 мкл 0.4% азоказеина, 200 мкл супернатанта, 5 мкл 250 мМ β -меркаптоэтанола и инкубировали в течение 12 ч при 30°C. Реакцию останавливали путем добавления 100 мкл 50% ТХУ, затем центрифугировали 10 мин при 10000 g. Оптическую плотность супернатанта измеряли при длине волны 330 нм с использованием спектрофотометра Lambda-25 (Perkin Elmer, США). Протеазную активность рассчитывали по изменению оптической плотности азоказеина и представляли в виде удельной активности в единицу времени, пересчитанной на количество белка в пробе ($U_{Pr}/\text{мин мкг}$).

Интенсивность перекисного окисления липидов определяли в растворимой фракции гомогената ткани мозга по содержанию малонового диальдегида (МДА), реагирующего с тиобарбитуровой кислотой. Образцы смешивали с реактивом, содержащим 0.3% Тритона X-100, 0.1 М HCl и 0.03 М 2-тиобарбитурата. Смесь инкубировали в течение 45 мин при 95°C, затем центрифугировали в течение

10 мин при 10000 g. Оптическую плотность измеряли при длине волны 532 нм с использованием спектрофотометра Lambda-25 (Perkin Elmer, США). Концентрация МДА в пробах рассчитывалась с использованием молярного коэффициента экстинкции ($\epsilon = 1.55 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) и выражалась в мкг/г ткани.

Содержание перекиси водорода (H₂O₂) определяли методом, основанным на реакции окисления пероксидами Fe(II) до Fe(III) с реагентом FOX1 и последующим образованием красно-фиолетового ферроксисенолового комплекса с максимумом поглощения при длине волны 560 нм с использованием спектрофотометра Lambda-25 (Perkin Elmer, США). В состав реагента входили: 0.5 мМ FeSO₄, 0.5 мМ (NH₄)₂SO₄, 50 мМ H₂SO₄, 0.2 мМ ксиленил оранжевый, 200 мМ сорбитол (Sigma Aldrich, США). Супернатант и реагент смешивали в соотношении 1 : 1 при комнатной температуре, через 30 мин измеряли оптическую плотность. Содержание H₂O₂ рассчитывали по стандартной калибровочной кривой с известными концентрациями H₂O₂ и выражали в мкг/г ткани.

Активность супероксиддисмутазы (SOD) определяли с помощью нитросинего тетразолия (NBT) в системе ксантин – ксантиноксидаза [39]. Реакционная смесь объемом 500 мкл содержала 100 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7.4), 0.1 мМ ЭДТА, 1 мМ цитохрома C, 1 мМ ксантина, 0.04 мМ NBT и 150 мкл образца. Реакция инициировалась добавлением 50 мкл 0.5 ед. ксантиноксидазы. Процентное ингибирование восстановления NBT, пропорциональное активности SOD, присутствующей в образце, определяли на спектрофотометре Lambda-25 (Perkin Elmer, США) при длине волны 560 нм. За единицу активности SOD принимали количество фермента, способного подавить на 50% реакцию восстановления NBT, а удельная активность выражали в единицах на миллиграмм белка ($U_{SOD}/\text{мин мкг}$).

Активность каталазы (CAT) определяли по скорости разложения H₂O₂ ($\epsilon = 0.44 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$) при длине волны 240 нм [39] с помощью спектрофотометра Lambda-25 (Perkin Elmer, США). Реакционная смесь (500 мкл) содержала 50 мМ HEPES (pH 7.0), 40 мМ H₂O₂ и 150 мкл образца. Реакцию инициировали добавлением H₂O₂. За единицу активности каталазы принимали количество субстрата (H₂O₂) в мкМ, преобразуемого ферментом в единицу времени (мин), рассчитанное на мг сырой ткани в пробе ($U_{CAT}/\text{мин мкг}$).

Активность глутатионпероксидазы (GPx) определяли по методу Вейдера и Каллена [40]. В присутствии глутатионредуктазы и НАДФН окисленный глутатион (GSH) превращается в восстановленную форму (GSSG) с сопутствующим окислением НАДФН в НАДФ. Скорость реакции, катализи-

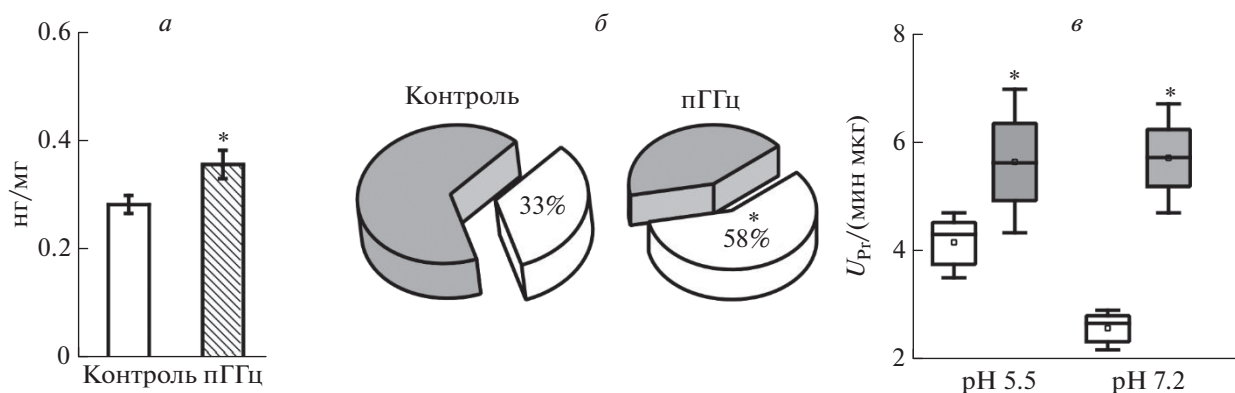


Рис. 1. Уровень ОМБ и протеолитической активности ферментов в головном мозге крыс с пренатальной ГГЦ. (а) Уровень спонтанной ОМБ в контроле и в условиях пренатальной ГГЦ (пГЦ). (б) Вклад спонтанной ОМБ в металл-катализируемое окисление, принятое за 100% в контроле и в условиях пренатальной ГГЦ. (в) Общая протеолитическая активность кислых (pH 5.5) и нейтральных (pH 7.2) протеаз в тканях мозга животных из контрольной (белый) и ГГЦ (серый) групп. Боксплот – 25–75% проценталь, усы – минимальное и максимальное значения, поперечная линия – медиана, квадрат – среднее значение. * $p < 0.05$ относительно контроля.

руемой GPx, оценивали с помощью спектрофотометра Lambda-25 (Perkin Elmer, США) по уменьшению оптической плотности раствора при длине волны 340 нм ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Реакционная смесь (400 мкл) состояла из 50 мМ Na_2HPO_4 буфера (pH 7.2), 1 мМ восстановленного глутатиона, 0.5 единицы глутатионредуктазы, 0.15 мМ НАДФН, 1 мМ ЭДТА и 150 мкл образца. Одна единица GPx определяется как 1 мкМ глутатиона, потребляемого в минуту, а удельная активность указывается в единицах на мг белка в минуту ($U_{\text{GPx}}/\text{мин мг}$).

Активность глутатионредуктазы (GR), которая катализирует НАДФН-зависимое восстановление окисленного глутатиона до восстановленного, определяли с помощью спектрофотометра Lambda-25 (Perkin Elmer, США) при длине волны 412 нм. Предварительно пробы разводили в NEPES (pH 8.0) до конечного объема 500 мкл в соотношении 1 : 9. Тиоловые группы ($-\text{SH}$) в пробе восстанавливали в течение 5 мин с использованием 10 мкл 3% H_2O_2 , затем образцы инкубировали в течение 5 мин с 10 мкл свежеприготовленного раствора каталазы (Sigma Aldrich, США). Реакцию инициировали внесением в пробу НАДФН в объеме 10 мкл до конечной концентрации 0.1 мМ. Активность глутатионредуктазы оценивали по изменению содержания глутатиона с помощью 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоты и выражали в единицах на мг белка (U_{GR} нмоль/мин мг).

Статистическая оценка различий в сравниваемых выборках оценивалась для 5% уровня значимости. Нормальность распределения выборки определяли при помощи F-теста Фишера и критерия Шапиро-Уилка с использованием программы OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, США). Достоверность различий оценивали с помощью критерия Манна-Уитни для непараметрических

выборок (OriginPro 8.5, OriginLab Corporation, Northampton, MA, США), где n – количество животных. Все измерения проводили не менее, чем в 3 параллельных пробах, используя для повторения животных из разных пометов. Экспериментальные данные в тексте представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования показали, что содержание продуктов спонтанной ОМБ в тканях мозга крыс с пренатальной ГГЦ в течение первой недели постнатального развития существенно выше, чем в контрольной группе. Средний уровень карбонильных производных в гомогенате мозга крыс (P2–P7) в контрольной группе составлял 0.28 ± 0.02 нг/мг белка ($n = 5$), а у крыс с пренатальной ГГЦ – 0.36 ± 0.03 нг/мг белка ($n = 5, p < 0.05$, рис. 1а).

Индукцированная ОМБ отражает количество всех имеющихся на данный момент в ткани молекул, которые могут подвергнуться карбонилированию [26]. У животных контрольной группы уровень металл-катализируемой ОМБ составил 0.86 ± 0.03 нг/мг белка ($n = 5$), тогда как у крыс с пренатальной ГГЦ количество индуцированной ОМБ было меньше – 0.61 ± 0.07 нг/мг белка ($n = 5, p < 0.05$). Далее был проведен анализ вклада спонтанной ОМБ в металл-индуцируемое окисление. Оказалось, что доля спонтанной ОМБ в группе ГГЦ составляла 58% ($n = 5, p < 0.05$), тогда в контрольной группе – 33% ($n = 5$; рис. 1б).

Известно, что продукты ОМБ способны вызывать повышение проницаемости мембран лизосом и усиливать активность лизосомальных ферментов [41]. В следующей серии экспериментов была проанализирована активность протеаз в тканях мозга

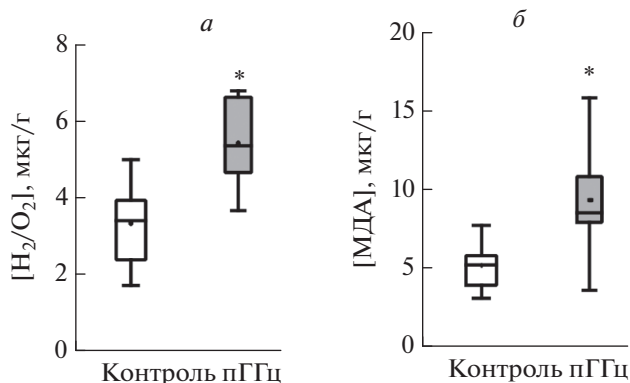


Рис. 2. Концентрация H_2O_2 (а) и маркера перекисного окисления липидов – МДА (б) в тканях головного мозга крыс с пренатальной ГГЦ. Боксплот – 25–75% проценталь, усы – минимальное и максимальное значения, поперечная линия – медиана, квадрат – среднее значение. * $p < 0.05$ относительно контроля.

крыс с пренатальной ГГЦ. Общая протеолитическая активность кислых протеаз при pH 5.5 составляла в контроле $4.16 \pm 0.23 U_{Pr}/\text{мин мкг}$ и в группе ГГЦ – $5.65 \pm 0.54 U_{Pr}/\text{мин мкг}$ ($n = 4$, $p < 0.05$, рис. 1в). Кроме того, наблюдали двукратное увеличение активности нейтральных протеаз в тканях мозга крыс с пренатальной ГГЦ ($5.72 \pm 0.41 U_{Pr}/\text{мин мкг}$, $n = 4$, $p < 0.05$, рис. 1б) по сравнению с группой контроля ($2.58 \pm 0.14 U_{Pr}/\text{мин мкг}$, $n = 5$).

АФК являются основными индукторами ОМБ [31]. Для оценки степени окислительного стресса исследовали уровень H_2O_2 и МДА, продукта перекисного окисления липидов в тканях головного мозга животных. Уровень H_2O_2 в контрольной группе составил 3.4 ± 0.4 мкг/г ($n = 15$), а в группе ГГЦ – 5.4 ± 0.5 мкг/г ($n = 6$, $p < 0.05$; рис. 2а). Уровень МДА в контрольной группе составил 5.2 ± 0.3 мкг/г ($n = 15$), а у животных группы ГГЦ – 9.4 ± 0.9 мкг/г ($n = 13$, $p < 0.05$; рис. 2б).

Активность антиоксидантных ферментов – SOD, CAT, GPx и GR была достоверно ниже у животных с пренатальной ГГЦ. Активность SOD в контроле составила $1.31 \pm 0.11 U_{SOD}/\text{мин мг}$ ($n = 13$) и в группе ГГЦ – $0.99 \pm 0.14 U_{SOD}/\text{мин мг}$ ($n = 12$, $p < 0.05$; рис. 3а). Активность CAT в контроле составила $39.31 \pm 5.35 U_{cat}/\text{мин мг}$ ($n = 7$), а у крыс с пренатальной ГГЦ – $21.91 \pm 4.54 U_{cat}/\text{мин мг}$ ($n = 7$, $p < 0.05$; рис. 3б).

В контроле показатели активности GPx и GR составляли $3.41 \pm 0.53 U_{GPx}/\text{мин мг}$ ($n = 11$) и $16.55 \pm 0.65 U_{GR}/\text{нмоль/мин мг}$ ($n = 6$), соответственно. У крыс с пренатальной ГГЦ активность GPx составляла $1.8 \pm 0.3 U_{GPx}/\text{мин мг}$ ($n = 10$, $p < 0.05$) и GR – $10.17 \pm 0.41 U_{GR}/\text{нмоль/мин мг}$ ($n = 6$, $p < 0.05$), соответственно (рис. 3в, г).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании было продемонстрировано, что высокий уровень гомоцистеина у самок во время беременности вызывает следующие изменения в ткани мозга потомства на первой неделе постнатального развития: повышение уровня карбонильных производных белков, увеличение доли спонтанного окисления в металл-индуцированной модификации белков, одновременно с выраженным снижением антиоксидантной защиты и усилением продукции перекиси водорода и перекисного окисления липидов, и повышение общей протеолитической активности.

Нервная ткань характеризуется высокой чувствительностью к повреждающему действию свободных радикалов из-за повышенного содержания субстратов перекисного окисления (полиненасыщенных жирных кислот и ионов металлов) и низкой активностью антиоксидантных ферментов в сочетании с высокой интенсивностью обменных процессов [42, 43]. Особенно это характерно для раннего периода онтогенеза, когда благодаря вы-

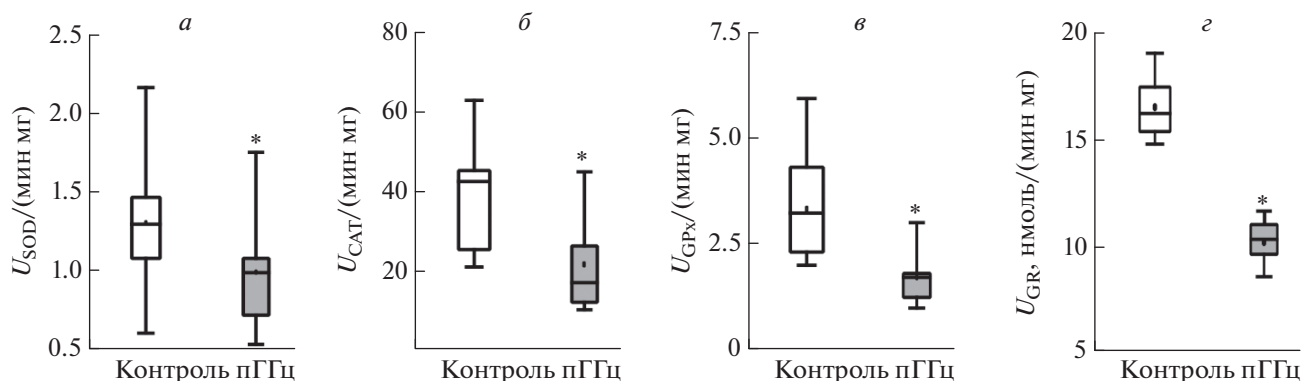


Рис. 3. Активность антиоксидантных систем супероксиддисмутазы (а), каталазы (б), глутатионпероксидазы (в) и глутатионредуктазы (г) в тканях мозга крыс с пренатальной ГГЦ. Боксплот – 25–75% проценталь, усы – минимальное и максимальное значения, поперечная линия – медиана, квадрат – среднее значение. * $p < 0.05$ относительно контроля.

сокому уровню нейропластичности происходит интенсивный нейрогенез, синаптогенез, что сопровождается повышением синтеза белков и липидов, нейроспецифических ростовых факторов и медиаторов [26].

Накопление гомоцистеина в ранний период онтогенеза в различных отделах головного мозга приводит к усилению перекисного окисления липидов, снижению общей антиокислительной активности и экспрессии адгезивных белков, участвующих в процессах синаптической пластичности [44], окислительному повреждению ДНК и белков [5], повышению активности каспазы-3 [21], что нарушает созревание нейрональных сетей в первые недели постнатального развития крыс [45]. Действительно, увеличение возбудимости нейронов наряду со снижением частоты гигантских деполяризирующих потенциалов, необходимых для установления межнейронных связей, было показано в гиппокампе новорожденных крыс с пренатальной ГГц [46].

ОМБ является одним из ранних и наиболее надежных маркеров окислительного стресса [47, 48], затрагивает рецепторы и каналы мембраны, белки цитоскелета, факторы транскрипции [49]. Ряд исследователей полагают, что ОМБ является превалирующим механизмом токсического действия гомоцистеина, приводящим к ингибированию Na^+/K^+ -АТФазы в нейронах гиппокампа и миндалины [50, 51], а также ферментов антиоксидантной защиты [23, 25, 52, 53]. Действительно, в наших экспериментах уровень карбонильных производных белков, являющихся одним из типов необратимой ОМБ в тканях мозга крыс с пренатальной ГГц, был выше на 30% по сравнению с контролем.

Известно, что в физиологических условиях интенсивность ОМБ повышается в течение раннего постнатального онтогенеза и зависит от процессов созревания нервной системы, в том числе миелинизации нервных волокон и формирования новых синапсов [48]. Максимальный пик ОМБ регистрировался к 2–3-м неделям постнатального развития мозга крыс. В то же время патологические факторы в период эмбриогенеза, включая пренатальный стресс, усиливают спонтанный и индуцированный ОМБ в гиппокампе, стриатуме и гипоталамусе крыс в первый месяц постнатального развития [26]. Нами было отмечено увеличение доли спонтанной ОМБ у животных с пренатальной ГГц с 33% до 58%, что говорит о значительном падении резервно-адаптационного потенциала клеток мозга и свидетельствует как о снижении устойчивости системы к действию свободных радикалов, так и о нарушении процессов метаболизма белков. Подобные изменения отмечались также в скелетной, сердечной и гладкомышечной тканях при умеренной ГГц у взрослых животных [54, 55].

Карбонилирование аминокислотных остатков способствует агрегации и фрагментации белковых

молекул и, как следствие, резкому повышению их чувствительности к деградации протеазами [56]. Дестабилизация лизосомальной мембраны в результате окислительного стресса вызывает высвобождение и активацию лизосомальных цистеиновых протеаз — катепсинов, что вызывает повреждение клеточных структур [57]. В наших экспериментах в ткани мозга крыс с пренатальной ГГц возрастала общая протеолитическая активность при pH 5.5, что указывает на активацию лизосомальных протеаз. Кроме того, мы наблюдали усиление активности цитоплазматических протеаз, что согласуется с данными об увеличении активности внелизосомальной фракции протеаз в клетках гладкой мускулатуры, печени и почек при ГГц [55]. Полученные данные свидетельствуют об активации системы протеолиза в первую неделю развития мозга крыс с пренатальной ГГц.

Триггером ОМБ является окислительный стресс, характерный для ГГц и показанный в нашем исследовании у животных первой недели после рождения, у которых наблюдалось высокое содержание H_2O_2 и МДА с одновременным снижением активности антиоксидантных ферментов — SOD, CAT, GPx и GR.

В условиях ГГц снижение активности SOD и CAT может быть обусловлено как инактивацией ферментов вследствие окисления тирозиновых аминокислотных остатков пероксинитритами и другими АФК, так и с угнетением их экспрессии за счет изменения метилирования ДНК [1, 19, 23, 30, 45, 53]. В условиях окислительного стресса из-за быстрого окисления глутатиона соотношение восстановленного/окисленного глутатиона падает [53]. Снижение активности как глутатионпероксидазы, так глутатионредуктазы, вызванное ГГц, может приводить к нарушению метаболизма глутатиона и уменьшению его уровня [8, 53, 58]. В результате полного или частичного истощения запасов глутатиона в клетках мозга крыс будет усиливаться карбонилирование белков и активность сериновых протеаз [60–62], что и наблюдалось в головном мозге крыс с пренатальной ГГц.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты нашей работы показывают значительное усиление необратимого процесса ОМБ в головном мозге новорожденных крыс с пренатальной ГГц вследствие развития окислительного стресса. Принимая во внимание описанные здесь эффекты и литературные данные, можно предложить, что в условиях ГГц матери в тканях мозга новорожденных крыс происходит ослабление антиоксидантной защиты, преобладание генерации АФК над их деградацией, накопление супероксидных и гидроксильных радикалов, что стимулирует перекисное окисление липидов и активирует ОМБ, которая, в свою очередь, может служить источником генерации новых свободных радикалов и дальнейшей инактивации антиоксидантных си-

стем, приводя к клеточной гибели и нарушению развития нервной ткани развивающегося организма.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета и поддержана ФИЦ КазНЦ РАН (Д.С.А.).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств РНФ 20-15-00100.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Исследование выполнено с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном обращении с животными и одобрено локальным этическим комитетом Казанского федерального университета (протокол № 8 от 05.05.2015).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арутюнян А.В., Керкешко Г.О., Милютин Ю.П., Щербицкая А.Д., Залозная И.В. // Биохимия. 2021. Т. 86. № 6. С. 871–884.
2. Marseglia L., D'Angelo G., Manti S., Arrigo T., Barberi I., Reiter R.J., Gitto E. // Oxid. Med. Cell. Longev. 2014. № 358375.
3. Мальцева Н.В., Волчегорский И.А., Шемяков С.Е. // Нейрохимия. 2017. Т. 34. № 1. С. 54–61.
4. Baydas G., Koz S.T., Tuzcu M., Nedzvetsky V.S., Etem E. // Int. J. Dev. Neurosci. 2007. V. 25. P. 133–139.
5. Koz S.T., Gouwy N.T., Demir N., Nedzvetsky V.S., Etem E., Baydas G. // Int. J. Dev. Neurosci. 2010. V. 28. P. 325–329.
6. Troen, A.M. // Prog. Neuropsychopharm. Biol. Psychiatry. 2005. V. 29. P. 1140–1151.
7. Арутюнян А.В., Пустыгина А.В., Милютин Ю.П., Залозная И.В., Козина Л.С. // Молекулярная медицина. 2015. № 5. С. 41–46.
8. Yakovleva O., Bogatova K., Mukhtarova R., Yakovlev A., Shakhmatova V., Gerasimova E., Ziyatdinova G., Hermann A., Sitdikova G. // Biomolecules. 2020. V. 10. № 7. P. 995.
9. Yakovleva O.V., Ziganshina A.R., Dmitrieva S.A., Arslanova A.N., Yakovlev A.V., Minibayeva F.V., Khaertdinov N.N., Ziyatdinova G.K., Giniatullin R.A., Sitdikova G.F. // Oxid. Med. Cell. Longev. 2018. V. 2018. № 2. P. 2746837–2746837.
10. Sharma M., Tiwari M., Tiwari R.K. // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2015. V. 117. P. 287–296.
11. Herrmann W., Obeid R. // Clin Chem Lab Med. 2011. V. 49. № 3. P. 435–441.
12. Gerasimova E., Burkhanova G., Chernova K., Zakharov A., Enikeev D., Khaertdinov N., Giniatullin R., Sitdikova G. // Behavioural Brain Resh. 2021. V. 409. P. 1–8.
13. Beard R.S., Reynolds J.J., Bearden S.E. // Blood. 2011. V. 118. № 7. P. 2007–2014.
14. Милютин Ю.П., Щербицкая А.Д., Салтыкова Е.Д., Козина Л.С., Журавин И.А., Наливаева Н.Н., Арутюнян А.В. // Росс. физ. журнал. им. И.М. Сеченова. 2017. Т. 103. № 11. С. 1280–1291.
15. Dai C., Fei Y., Li J., Shi Y., Yang X. // BioMed. Res. International. 2021. V. 2021. № 6652231.
16. Bolton A.D., Phillips M.A., Constantine-Paton M. // J. Neurophysiol. 2013. V. 16. № 110. P. 1567–1582.
17. Abushik P.A., Niitykoski M., Giniatullina R., Shakhirzyanova A., Bart G., Fayuk D. // J. Neurochem. 2014. V. 11. № 129. P. 264–274.
18. Lipton S.A., Kim W.K., Choi Y.B., Kumar S., D'Emilia D.M., Rayuda P.V., Arnelle D.R., Stamper J.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997. V. 94. P. 5923–5928.
19. Sibarov D.A., Abushik P.A., Giniatullin R., Antonov S.M. // Front. Cell. Neurosci. 2016. V. 10. № 246.
20. Курмашова Е.Д., Гатаулина Э.Д., Зефиоров А.Л., Ситдткова Г.Ф., Яковлев А.В. // Росс. физ. журнал. им. И.М. Сеченова. 2019. Т. 105. № 10. С. 1236–1246.
21. Арутюнян А.В., Милютин Ю.П., Щербицкая А.Д., Керкешко Г.О., Залозная И.В., Михель А.В. // Биохимия. 2020. Т. 85. № 2. С. 248–259.
22. Арутюнян А.В., Козина Л.С., Арутюнов В.А. // Журнал акушерства и женских болезней. 2010. № 59. С. 16–23.
23. Pustygina A.V., Milyutina Y.P., Zaloznyaya I.V., Arutyunyan A.V. // Neurochem. J. 2015. V. 9. P. 60–65.
24. Longoni A., Bellaver B., Bobermin L.D., Santos C.L., Nonose Y., Kolling J., Dos Santos T.M., de Assis A.M., Quincozes-Santos A., Wyse A.T.S. // Mol. Neurobiol. 2018. V. 55. № 3. P. 1966–1976.
25. Shcherbitskaia A.D., Vasilev D.S., Milyutina Yu.P., Tumanova N.L., Mikhel A.V., Zalozniaia I.V., Arutyunyan A.V. // Cells. 2021. V. 10. № 6. P. 1536.
26. Вьюшина А.В., Притворова А.В., Флеров М.А. // Нейрохимия. 2012. Т. 29. № 3. С. 240–246.
27. Cindrova-Davie T., Herrera E.A., Niu Y., Kingdom J., Giussani D.A., Burton G.J. // Am. J. Pathol. 2013. V. 182. P. 1448–1458.
28. Дубинина Е.Е. Физиологические и клиничко-биохимические аспекты. СПб.: Медицинская пресса, 2006. 400 с.
29. Sibrian-Vazquez V., Escobedo J.O., Lim S., Samoei G.K., Strongin R.M. // Proc. National Academy of Sciences. 2010. V. 107. № 2. P. 551–554.
30. Perla-Kajan J., Twardowski T., Jakubowski H. // Amino Acids. 2007. V. 12. № 32. P. 561–572.
31. Stadtman E.R. // Free Radical Res. 2006. V. 40. P. 1250–1258.
32. Reinheckel T., Noack H., Lorenz S., Wiswedel I., Augustin W. // Free Radical Res. 1998. V. 29. P. 297–305.
33. Телушкин П.К. // Проблемы эндокринологии. 1998. Т. 44. № 3. С. 35–37.
34. Nyström T. // EMBO J. 2005. V. 24. № 7. P. 1311–1317.
35. Gerasimova E.E., Yakovleva O.V., Burkhanova G., Ziyatdinova G., Khaertdinov N., G. Sitdikova G. // BioNanoScience. 2017. V. 7. № 1. P. 55–158.
36. Parasuraman S., Raveendran R., Kesavan R. // J. Pharmacology & Pharmacotherapeutics. 2010. V. 1. № 2. P. 87–93.
37. Teixeira de Oliveira D., Souza-Silva E., Tonussi C.R. // Scand. J. Lab. Anim. Sci. 2009. V. 36. № 2. P. 109–113.
38. Śliwa-Józwiak A., Józwiak I.A., Fronczyk W., Guszkiwicz I.A., Kołataj A. // Animal Science Papers and Reports. 2004. V. 22 № 2. P. 237–245.

39. Fulle S., Di Donna S., Puglielli C., Pietrangelo T., Beccafico S., Bellomo R., Protasi F., Fanò G. // *Exp. Gerontol.* 2005. V. 40. P. 189–197.
40. Weydert C.J., Cullen J.J. // *Nat Protoc.* 2010. V. 5. P. 51–66.
41. Brunk, U.T. Neuzil J., Eaton J.W. // *Redox Rep.* 2001. V. 6. № 2. P. 91–97.
42. Aruoma O., Halliwell B., Laughton M.J. // *Biochem. J.* 1989. V. 258. № 2. P. 617–620.
43. Болдырев А.А. // Соросовский образовательный журнал 2001. № 4. С. 21–28.
44. Hoffman K.B., Murray B.A., Lynch G., Munirathinam S., Bahr B.A. // *Neuroscience Res.* 2001. V. 39. № 2. P. 167–173
45. Blaise S.A., Nédélec E., Schroeder H., Alberto J.M., Bossenmeyer-Pouricé C., Guéant J.L., Daval J.L. // *The American Journal of Pathology.* 2007. V. 170. № 2. P. 667–679.
46. Yakovlev A.V., Kurmasheva E.D., Giniatullin R., Khalilov I., Sitdikova G.F. // *Neurosci.* 2017. V. 340. P. 153–165.
47. Губский Ю.И., Беленичев И.Ф., Павлов С.В., Левицкий Е.Л., Бухтиярова Н.В. // *Современные проблемы токсикологии.* 2006 Т. 2. С. 37–43.
48. Bizzozero O.A. // *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* / Ed. Lajtha A., Banik N., Ray S.K. Boston: Springer, 2009. P. 543–562.
49. Wehr N.B., Levine R.L. // *Methods Mol. Biol.* 2013. V. 965. P. 265–281.
50. Streck E.L., Matte C., Vieira P.S., Rombaldi F., Wannmacher C.M.D., Wajner M., Wyse A.T.S. // *Neurochem. Res.* 2002. V. 27. № 12. P. 1593–1598.
51. Matte C., Mackedanz, V., Stefanello, F.M., Schererna E.B.S. Andrezza A.C., Zanotto C., Moro A.M., Garcia S.C., Gonçalves C.A., Erdtmann B., Salvador M., Wyse A.T.S. // *Neurochem. Int.* 2009. V. 54. P. 7–13.
52. Durmaz A., Dikmen N. // *J Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2007. V. 22. № 6. P. 733–738.
53. Lubos E., Loscalzo J., Handy D.E. // *Antioxid. Redox Signal.* 2007. V. 9. P. 1923–1940.
54. Ильичева А.С., Фомина М.А. // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова.* 2015. Т. 1. С. 45–51.
55. Фомина М.А., Терентьев А.А. // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова.* 2018. Т. 26. № 2. С. 195–212.
56. Shringarpure R., Davies K.J.A. // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. V. 32. № 11. P. 1084–1089.
57. Tiwari S.C., Soni R.M. // *J. Alzheimer's Disease & Parkinsonism.* 2014. № 4. P. 5–9.
58. Durmaz A., Dikmen N. // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2007. V. 22. № 6. P. 733–738.
59. Dasgupta A., Zheng J., Bizzozero O.A. / *ASN NEURO.* 2012. V. 4. № 3. art: e00084.
60. Zheng J., Hu Ch.-L., Shanley K.L., Bizzozero O.A. // *Neurochem. Res.* 2018. V. 43. P. 609–618.
61. Mandaviya P.R., Stolk L., Heil S.G. // *Mol. Genet. Metab.* 2014. V. 113. P. 243–252.
62. de Moreira S.D., Figueiró P.W., Siebert C., Prezzi C.A., Rohden. F, Guma F.C.R., Manfredini V., Wyse A.T.S. // *Neurotox. Res.* 2018. V. 33. № 3. P. 580–592.

Levels of Protein Carbonylation and Activity of Proteases in the Brain of Newborn Rats with Prenatal Hyperhomocysteinemia

A. V. Yakovlev^a, S. A. Dmitrieva^b, A. N. Krasnova^a, O. V. Yakovleva^a, and G. F. Sitdikova^a

^a Kazan Federal University, Kazan, Russia

^b Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia

Homocysteine is a sulfur-containing amino acid formed from methionine and considered as a risk factor for a number of pathologies. An increase in the homocysteine level (hyperhomocysteinemia, HHcy) during pregnancy leads to various complications of pregnancy, fetal hypoxia and, consequently, development of early and delayed postnatal pathologies. One of the main mechanisms of homocysteine action is induction of oxidative stress. The aim of our study was to analyze oxidative modification of proteins and activity of proteases, as well as the level of oxidative stress in the brain tissue of rats with prenatal HHcy in the first week after birth. The experimental HHcy was induced in female rats by feeding them with elevated amounts of methionine for 3 weeks before, during and after pregnancy. In the homogenates of brain tissue of offspring with prenatal HHcy a significant increase in spontaneous protein carbonylation was observed. This result indicates a decrease in the reserve-adaptive potential of brain cells and the decrease in the resistance of the tissue to the action of free radicals. In the brains of rats with prenatal HHcy the activity of acidic and neutral proteases was higher compared to controls which could be a result of aggregation and fragmentation of protein molecules due to carbonylation of amino acid residues. Brain tissues of newborn rats with prenatal HHcy were also characterized by a high content of hydrogen peroxide, malondialdehyde as the marker of lipid peroxidation, along with a decrease in the activity of antioxidant enzymes: superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase. Thus, the data obtained indicate a significant increase in the irreversible process of oxidative modification of proteins in the brain of newborn rats with prenatal HHcy because of the oxidative stress. These processes contribute to the mechanisms of homocysteine neurotoxicity during the critical period of brain development in the early postnatal period, when intensive neurogenesis, synaptogenesis, and neuroplasticity take place.

Keywords: oxidative modification of proteins, prenatal hyperhomocysteinemia, brain, proteases, antioxidant systems, lipid peroxidation

УДК 577

РОЛЬ ИНФЛАММАСОМ В ПАТОГЕНЕЗЕ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

© 2022 г. Д. В. Шевчук¹, А. А. Абрамова¹, М. Н. Захарова¹, *¹ ФГБНУ “Научный центр неврологии”, Москва, Россия

Поступила в редакцию 11.03.2022 г.

После доработки 14.03.2022 г.

Принята к публикации 15.03.2022 г.

Отличительной особенностью большинства нейродегенеративных заболеваний является нарушение фолдинга, агрегация и накопление патологических белков, что приводит к нарушению клеточного гомеостаза, вследствие этого – потере синаптических связей и, в конечном итоге, клеточному апоптозу. Показано, что некоторые реакции врожденного иммунитета играют важную роль в возникновении и прогрессировании нейродегенеративных заболеваний. Одним из ключевых звеньев врожденного иммунитета, способствующим поддержанию хронического воспалительного ответа, являются инфламмосомы. Инфламмосомы играют роль “внутриклеточных сенсоров”, осуществляя детекцию как экзогенных, так и эндогенных стимулов, а также отвечая за активацию каспазы-1 и синтез провоспалительных цитокинов. В центральной нервной системе (ЦНС) инфламмосомы экспрессируются преимущественно микроглией, основными клетками врожденного иммунитета, ответственными за активацию и поддержание процессов воспаления. Помимо микроглии, экспрессию и активацию инфламмосом могут осуществлять астроциты и нейроны, а также инфильтрирующие миелиодные клетки. Понимание механизмов активации и функционирования инфламмосом может лежать в основе разработки новых специфических препаратов для модуляции иммунного ответа, связанного с их чрезмерной активацией. В обзоре приведены основные сведения о строении и механизмах функционирования инфламмосом, рассмотрена роль нарушения фолдинга белков, их агрегации и влияния на активацию инфламмосом, а также возможные терапевтические мишени в контексте нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: инфламмосомы, нейродегенеративные заболевания, боковой амиотрофический склероз, болезнь двигательного нейрона, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона

DOI: 10.31857/S1027813322030116

ОБЩИЕ МЕХАНИЗМЫ НАКОПЛЕНИЯ И АГРЕГАЦИИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ БЕЛКОВ

Необходимым условием нормальной работы белка является приобретение им третичной структуры, которая формируется в ходе его “упаковки” – фолдинга. Фолдинг представляет собой сложный, мультисистемный процесс, где ключевую роль играют белки-шапероны, обеспечивающие правильную укладку белка и стабильную конформацию. Помимо фолдинга для правильной укладки белковых цепей важны и другие молекулярные процессы, такие как транскрипция, трансляция, посттрансляционные модификации, деградация, опосредованная системой убиквитин-протеасома и аутофагия.

Приобретение белком правильной конформации обеспечивается особым классом белков – шаперонов. Они связываются с пептидами еще до

завершения процесса трансляции с мРНК, и участвуют в процессе фолдинга, защищая растущие пептидные цепи от воздействий частиц клеточной среды, тем самым облегчая формирование стабильной конформации [1]. Если фолдинг белка происходит неправильно, белки-шапероны исправляют развернутый белок, а в случае неудачи выступают в качестве сигнальных молекул и, в зависимости от конкретной причины, могут активировать различные клеточные программы для принятия радикальных мер по устранению белка с неправильной структурой вплоть до полной деградации [2]. Этими клеточными программами являются: отклик неструктурированных белков (unfolded protein response, UPR), реакция теплового шока (heat shock response, HSR), убиквитин-протеасомная система (ubiquitin-proteasome system, UPS) и деградация, связанная с эндоплазматическим ретикулумом (endoplasmic-reticulum-associated degradation, ERAD). Программы UPR и HSR образуют сеть клеточного протеостаза для создания прого-

* Адресат для корреспонденции: 125367 Россия, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80; e-mail: zakharova@neurology.ru.

меостатических транскрипционных и посттранскрипционных программ [3].

Существует несколько гипотез, объясняющих нарушение процесса фолдинга белка. Во-первых, в случае правильной трансляции с использованием предполагаемых аминокислотных последовательностей может быть найдена альтернативная стабильная конформация белка, что приведет к нарушению фолдинга. Во-вторых, генетические мутации также приводят к нарушению укладки белка и, соответственно, его функции; при этом даже одна «ошибочная» аминокислота может привести к неправильному фолдингу, агрегации белка и возможной клеточной смерти.

Некоторые гены могут производить несколько вариантов белков. В этих случаях определенные экзоны первичного транскрипта могут быть включены или исключены из конечной синтезированной мРНК. Этот процесс носит название альтернативного сплайсинга. Белки, полученные в результате трансляции с таких мРНК, будут отличаться как по своим аминокислотным последовательностям, так и нередко — по биологическим функциям. Ошибка, возникнувшая во время альтернативного сплайсинга, может привести к синтезу белка с неправильной аминокислотной последовательностью и, в конечном итоге, нарушенной третичной структурой.

Наконец, возможно нарушение фолдинга из-за мутаций в генах белков-шаперонов, вследствие чего наблюдается преобладание альтернативных конформаций белков. В то же время мутации в генах, ответственных за деградацию патологических белков, будут способствовать избеганию продуктами нарушенного фолдинга элиминации, и их дальнейшей агрегации, и образованию фибрилл. Любая из вышеперечисленных мутаций может вызвать гибель клетки, однако, если ей удалось избежать апоптоза, это может привести к развитию нейродегенеративного процесса [4, 5].

Помимо мутации в генах, нарушение фолдинга белка также может быть связано с клеточной патологией, а именно — с дисфункцией митохондрий, кальций-индуцированным нарушением фолдинга и воспалением [4]. Нарушение нормального функционирования митохондрий приводит к увеличению количества реактивных форм кислорода вследствие нарушения процессов окислительно-фосфорилирования, что в свою очередь может повлечь за собой повреждение структуры белков [6]. Кальций-индуцированное нарушение фолдинга белка часто сопровождается патологическими состояниями, характеризующимися избытком глутамата в синаптической щели, что приводит к гиперстимуляции NMDA-рецепторов и последующему притоку кальция. Избыток цитозольного кальция также может приводить к генерации активных форм кислорода и нитрозативному стрессу,

нарушающему механизмы контроля синтеза белка, тем самым способствуя накоплению белков с нарушенной конформацией [7]. Неправильно упакованные белки могут образовывать трансмембранные поры, которые дополнительно увеличивают приток кальция, приводя к порочному циклу цитотоксичности [8].

Основным механизмом развития большинства нейродегенеративных заболеваний является нарушение белкового гомеостаза (протеостаза), приводящего к формированию патологической конформации белков, их агрегации, накоплению и развитию нейротоксичности. Клинические проявления нейродегенеративных заболеваний обычно зависят от вовлечения в патологический процесс определенной популяции нейронов [9].

К заболеваниям, развивающимся вследствие неправильного фолдинга и агрегации белков, относятся болезнь Альцгеймера, болезнь Гентингтона, боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона, трансмиссивные губчатые энцефалопатии [9].

Предложено по крайней мере три механизма, посредством которых неправильная укладка и агрегация белков приводят к развитию болезней нарушенного фолдинга. Так, одним из ключевых звеньев патогенеза нейродегенеративных заболеваний может являться потеря нормальной активности белка, количество которого истощается вследствие неправильного фолдинга и агрегации. Согласно второй и более широко принятой гипотезе, неправильная укладка и агрегация приводят к приобретению белками с нарушенной третичной структурой свойств нейротоксичности, которые проявляются в способности этих белков и их агрегатов активировать проапоптотические сигнальные пути, образовывать ионные каналы и индуцировать процессы окислительного стресса. Наконец, ряд авторов объясняют патогенез нейродегенеративного процесса с точки зрения нейровоспаления, предполагая, что аномальные белковые агрегаты действуют как антигены и вызывают хроническую воспалительную реакцию, которая приводит к гибели клетки, вероятно, активируя процессы врожденного иммунитета, в частности, опосредуемые различными типами инфламмасом [10]. В настоящем обзоре освещены ключевые вопросы строения и функционирования инфламмасом, а также современные данные об их роли при ряде нейродегенеративных заболеваний.

РОЛЬ ВОСПАЛЕНИЯ ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ

Нейровоспаление является защитным механизмом, который прежде всего призван элиминировать различные патогены, нарушающие гомеостаз [11]. Воспалительный ответ, возникающий в усло-

виях патологии, имеет благоприятные эффекты, способствуя удалению клеточного мусора и восстановлению целостности и гомеостаза тканей, однако хронизация воспалительного ответа пагубна и, напротив, препятствует процессам регенерации [12]. Стимулы, поддерживающие воспалительный ответ, могут иметь как эндогенный характер (например, генетическая мутация и агрегация белков), так и исходить из окружающей среды — в виде инфекции, травматического повреждения или токсического воздействия, в том числе лекарственными препаратами [13].

Врожденный иммунитет является первой линией защиты не только от инфекционных агентов. Его механизмы также играют ключевую роль в восстановлении тканей, удалении апоптотических телец и клеточного мусора. Ключевыми клетками врожденного иммунитета в ЦНС являются микроглия и астроциты, макрофаги, естественные киллеры (NK) и тучные клетки. Олигодендроциты и нейроны также вносят свой вклад в процессы врожденного иммунного ответа в ЦНС. Патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMP) и ассоциированные с повреждением (эндогенным) молекулярные паттерны (DAMP) включают неправильно свернутые и агрегированные белки, как, например, при болезни Альцгеймера (БА), болезни Паркинсона (БП) и боковом амиотрофическом склерозе (БАС). Клеточными рецепторами, распознающими PAMP и DAMP, являются Toll-подобные рецепторы, лектины С-типа, детекторы окисленного липопротеина, а также NLR-рецепторы, играющие ключевую роль в сборке инфламмасом [14].

Клетки микроглии являются основными резидентными макрофагами в ЦНС. В онтогенезе нервной системы они участвуют в процессах формирования нейронных цепей, синаптогенезе, а также регулируют гибель клеток и элиминацию продуктов жизнедеятельности в условиях воспаления или повреждения ЦНС. Дифференциальная активация микроглии часто классифицируется как классическая (M1) или альтернативная (M2) на основании экспрессии хемокинов и цитокинов *in vivo* [15]. Переключение между этими фенотипами микроглии необходимо для осуществления процессов регенерации и ремиелинизации. Микроглия синтезирует как провоспалительные, так и противовоспалительные факторы, которые могут влиять благоприятно или же, наоборот, усугублять течение нейродегенеративных заболеваний [16].

Подобно M1 и M2 фенотипам макрофагов и микроглии, сообщается о субпопуляциях астроцитов, которые продуцируют провоспалительные медиаторы (A1) и иммунорегуляторные медиаторы (A2). Астроциты A1 секретируют IL-1 α , фактор некроза опухоли альфа (TNF α) и C1q компонент

комплемента. Данный фенотип считается провоспалительным и способствует повреждению нейронов и олигодендроцитов *in vitro*, а также вызывает апоптоз, подавляя активацию и пролиферацию Т-хелперных клеток. Напротив, астроциты A2 фенотипа обладают нейропротективным действием, способствуя выживаемости нейронов и процессам синаптической пластичности. Процесс астроглиоза наблюдается при многих нейродегенеративных заболеваниях, включая БА, БП и БАС [17]. Было высказано предположение, что реактивные астроциты A1 фенотипа обладают токсическим действием при БАС, БП и БА, шизофрении и при нормальном старении [18].

Помимо перечисленных видов клеток, олигодендроциты также участвуют в реакциях врожденного иммунитета, экспрессируя рецепторы и производя иммуномодулирующие цитокины и хемокины. При поражении ЦНС олигодендроциты могут способствовать как защитным и регенеративным процессам, так и нейродегенерации вследствие нарушения процессов ремиелинизации [19].

Роль адаптивного иммунитета при нейродегенеративных расстройствах подтверждается изменениями субпопуляций Т- и В-клеток и уровней антител в крови, спинномозговой жидкости и тканях мозга. Так, активно изучается роль реакций адаптивного иммунитета при БП и БАС; при БА воспаление в основном обусловлено резидентной микроглией. На ранних стадиях болезни Паркинсона в крови наблюдается повышенное количество Th17-клеток, некоторые из которых распознают α -синуклеин [20]. На мышинных моделях с БАС уменьшение количества Treg клеток сопровождалось более выраженными темпами гибели двигательных нейронов и меньшей выживаемостью животных, в то время как перенос Treg клеток подавлял нейровоспаление и приводил к увеличению продолжительности жизни мышей. Сообщается, что у пациентов с БАС имеются нарушения в функционировании Treg клеток, однако напрямую влияние их дисфункции на прогрессирование нейродегенерации у человека не исследовалось [21].

СТРОЕНИЕ, АКТИВАЦИЯ И ФУНКЦИИ ИНФЛАММАСОМ

Термин “инфламмасома” (inflammasome) был введен J. Tschopp и соавт. в 2002 г. для описания высокомолекулярного комплекса, присутствующего в цитозоле активированных иммунных клеток, опосредующего активацию провоспалительных каспаз [22]. Впоследствии были идентифицированы несколько различных инфламмасом, сборка каждой из которых продиктована уникальным паттерн-распознающим рецептором (pattern-recognition receptor, PRR) в ответ на патоген-ассоциированные молекулярные структуры

(pathogen-associated molecular patterns, PAMP) или эндогенные стимулы в цитозоле клетки-хозяина (damage-associated molecular patterns, DAMP) [23].

Распознавание провоспалительного лиганда приводит к активации инфламмосомы, олигомеризации и рекрутированию адапторного белка, известного как ASC (adaptor molecule apoptosis-associated speck-like protein), который состоит из двух доменов: пиринового домена (pyrin domain, PYD) и домена активации и рекрутирования каспазы (caspase activation and recruitment domain, CARD). Эти домены позволяют адапторному белку соединять сенсорную молекулу инфламмосомы с каспазой-1. Автопроцессинг приводит к образованию каталитически активной — каспазы-1, которая инициирует последующие ответы, включая высвобождение интерлейкина-1 β (IL-1 β) и IL-18, и вызывает пироптоз — запрограммированную гибель клеток, опосредуемую газдермином-D, притоком ионов натрия и воды, в результате которого происходит набухание клетки и разрыв мембраны, а также спонтанный выброс цитозольного содержимого во внеклеточное пространство. При активации инфламмосом каспаза-1 и другие неканонические каспазы (каспаза-4, каспаза-5 и каспаза-11) активируют газдермин-D, который впоследствии формирует поры в клеточной мембране. Благодаря им происходит секреция IL-1 β и IL-18 во внеклеточное пространство, и одновременный приток Na⁺ и воды, вызывая набухание клеток и разрыв мембраны [24].

Инфламмосомы играют ключевую роль в защите организма от патогенов, однако их гиперактивация связана с развитием онкологических, аутоиммунных, метаболических и нейродегенеративных заболеваний.

Классификация инфламмосом основана главным образом на сенсорной молекуле — основном триггере, участвующим в их активации. Различные сенсорные молекулы инфламмосом имеют сходную структуру и могут принадлежать к группе паттерн-распознающих рецепторов, способных реагировать на цитозольные патоген-ассоциированные молекулярные структуры (PAMP) или эндогенные стимулы (DAMP). К таким рецепторам относятся нуклеотид-связывающий домен и семейство рецепторов, богатых лейцином (nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat containing, NLR), также в состав инфламмосом могут входить AIM2 (absent in melanoma 2-like) и пириновые рецепторы.

В структуре инфламмосомы обычно имеются три основных компонента: цитозольный паттерн-распознающий рецептор, каспаза-1 и адапторный белок, опосредующий взаимодействие между ними. Как уже было упомянуто выше, рецептор может относиться либо к семейству белков NLR, либо

содержащих пириновый или HIN (hematopoietic interferon-inducible nuclear protein)-домены AIM2 белок). NLR у человека кодируются семейством из 22 генов и содержат карбоксиконцевой домен, богатый лейциновыми повторами (leucine-rich repeat, LRR), консервативный центральный домен NACHT (domain present in NAIP, CIPITA, HET-E, TP-1), который необходим для связывания нуклеотидов и олигомеризации белков, участвующих в образовании инфламмосом, а также варибельный аминоконцевой домен, определяющий принадлежность к подсемейству NLR [25].

NLR-инфламмосомы могут быть сгруппированы в два основных подсемейства, NLRP и NLRC — в зависимости от того, чем представлен N-концевой домен: пирином или N-концевым доменом активации и рекрутирования каспазы (caspase activation and recruitment domain, CARD) [26]. У человека идентифицировано 14 NLRP и 5 NLRC генов; наиболее изученными являются NLRP1 и NLRP3. В обоих подсемействах имеются общие черты: C-концевой повторяющийся домен богатый лейцином и центральный домен NACHT, ответственный за олигомеризацию [27].

После активации и олигомеризации NLRP рекрутируют адаптерный протеин ASC, являющийся вторым компонентом большинства инфламмосом. Как уже было сказано, ASC состоит из двух доменов: пирина (PYD) и CARD. Он действует как связующее звено между PYD соответствующего белка-рецептора NLRP и CARD прокаспазы-1, которая является третьим компонентом инфламмосомы. Исключениями являются NLRC4 и NLRP1, поскольку они могут напрямую взаимодействовать с прокаспазой 1 через собственные CARD домены [28].

Учитывая значимую роль NLRP3 инфламмосом в механизмах нейродегенерации, рассмотрим процесс активации инфламмосом на ее примере.

Активация NLRP3 инфламмосомы может быть опосредована 3 путями: каноническим, неканоническим и альтернативным. Канонический путь представляет собой классическую двухступенчатую модель, в которой для активации инфламмосомы NLRP3 необходимы два сигнала. Первый сигнал, или прайминг, необходим для связывания толл-подобных рецепторов (toll-like receptors, TLR) с патоген-ассоциированными молекулярными структурами (PAMP). Он индуцирует транскрипцию NLRP3, про-IL-1 β и про-IL-18 посредством активации ядерного фактора-kB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF-kB) [29]. При этом первый сигнал способствует не только активации транскрипции, но и индуцирует ряд посттрансляционных модификаций, которые позволяют NLRP3 перестраиваться в его

активную конформацию [30]. Второй сигнал запускается различными стимулами, включая PAMP, DAMP и другие частицы, детекцию которых NLRP3 осуществляет посредством еще не определенных механизмов. Второй сигнал приводит к образованию активного комплекса инфламماسомы и аутопротеолитическому расщеплению каспазы-1. Особенностью инфламماسомы NLRP3 является способность реагировать на широкий спектр сигналов, таких как внеклеточный аденозинтрифосфат (АТФ), микробные токсины, кристаллы, белковые агрегаты и вирусные частицы. Точный молекулярный механизм, запускающий активацию NLRP3 в ответ на такой широкий спектр сигналов, до сих пор изучен не полностью. Многие активаторы NLRP3 вызывают отток K^+ из клетки, что изначально считалось общим пусковым механизмом активации NLRP3 инфламماسомы [31]. Появляется все больше доказательств в пользу того, что наряду с оттоком K^+ , другие механизмы могут вносить вклад в активацию NLRP3, такие как отток Cl^- , передача сигналов Ca^{2+} , дисфункция митохондрий с активными формами кислорода и разрыв лизосом [32]. Учитывая разнообразие возможных активирующих сигналов, вероятно, что NLRP3 реагирует на общий механизм активации, индуцированный в цитозольной среде внутриклеточными процессами, а не взаимодействуя напрямую со всеми молекулами-активаторами [32].

Неканоническая активация запускается каспазой-4 у людей и каспазой-11 у мышей в ответ на внутриклеточное инфицирование грамотрицательными бактериями (например, *Escherichia coli*) [33]. Считается, что каспаза-11 и каспаза-4 активируются внутриклеточным липополисахаридом (LPS) посредством прямого связывания LPS с CARD-доменом. Кроме того, каспазу-4 и каспазу-11 могут активировать и другие компоненты грамотрицательных бактерий, а также экзогенные препараты, например, метамфетамин [34]. Активация каспазы-11 и каспазы-4, опосредованная внутриклеточным LPS, может способствовать оттоку K^+ из клетки либо за счет расщепления гасдермина D и последующего пироптоза, либо с помощью других неизвестных в настоящее время механизмов, ведущих к нестабильности мембраны. В итоге, вследствие оттока K^+ из клетки происходит активация инфламماسомы NLRP3 [35].

Альтернативная активация инфламмасом представляет собой новый специфический путь активации инфламмасомы NLRP3. Он присутствует в мононуклеарных клетках периферической крови человека и свиней, но отсутствует у мышей [36]. В рамках данного механизма активации, присутствия липополисахарида достаточно, чтобы вызвать активацию инфламмасомы NLRP3 с последующей ак-

тивацией процессинга и секреции каспазы-1 и IL-1 β . Сборка инфламмасомы происходит после активации толл-подобного рецептора 4 (TLR4) с помощью липополисахарида, запускающего сигнальный каскад каспазы-8, который, в свою очередь, приводит к активации инфламмасомы NLRP3. Этот путь активации не зависит от оттока K^+ из клетки. Пироптоза не происходит, поэтому IL-1 β высвобождается постепенно, в отличие от реакции “все или ничего”, характерной для канонической активации [37].

Считается, что рекрутирование прокаспазы-1 в инфламмасому вызывает аутопротеолитическое превращение профермента в активную каспазу-1. Активация каспазы-1 приводит к расщеплению и последующему высвобождению IL-1 β и IL-18, в первую очередь из клеток врожденного иммунитета. Центральная нервная система особенно чувствительна к передаче сигналов IL-1 β и IL-18 в связи с тем, что несколько типов клеток в ЦНС экспрессируют рецепторы для этих цитокинов [38]. Сигнальные каскады, индуцируемые цитокинами, оказывают влияние как на системном уровне (патологическая активация оси гипоталамус-гипофиз-надпочечники), так и на местном уровне повреждения (пролиферация и активация микроглии и астроцитов) [39]. Активация каспазы-1, последующее расщепление и высвобождение цитокинов способствуют развитию иммунопатологических состояний, которые приводят к гибели нейронов. Помимо индукции высвобождения цитокинов, активация каспазы-1 может опосредовать пироптоз. Есть данные, свидетельствующие о том, что каспаза-1 играет непосредственную роль в инициации гибели нейронов [40].

Изучение функционирования инфламмасом при процессах нейровоспаления позволяет увидеть в новом свете теорию о роли инфекционных заболеваний в провокации аутоиммунных и дегенеративных заболеваний нервной системы. Например, доказана роль NLRP3 инфламмасом в развитии и более тяжелом течении острого респираторного дистресс-синдрома, наблюдаемого в том числе при новой коронавирусной инфекции COVID-19; так, белок ORF3a коронавирусов приводит к индукции активности NLRP3 инфламмасомы [41]. В многочисленных исследованиях цитокинового профиля в крови пациентов с инфекцией COVID-19 убедительно продемонстрировано повышение уровней IL-1 β и IL-18, что может служить еще одним аргументом в пользу гиперактивации NLRP3 инфламмасом при этом заболевании [42]. Основываясь на этих данных, ряд авторов не исключает возможность провокации или усугубления течения нейродегенеративных заболеваний у пациентов, перенесших инфекцию COVID-19 [43].

АКТИВАЦИЯ ИНФЛАММАСОМ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ. ПАТОЛОГИЧЕСКИЕ БЕЛКИ – ИНДУКТОРЫ АКТИВАЦИИ ИНФЛАММАСОМ

Большинство нейродегенеративных заболеваний обладают общими патогенетическими механизмами, основным из которых является нарушение фолдинга белка. Белок с нарушенной конформацией многократно синтезируется и подвергается некорректному фолдингу, избегая как механизмов его правильной укладки, так и механизмов деградации патологических белков, что приводит к образованию агрегатов, которые в дальнейшем формируют фибриллярные структуры. При внеклеточной локализации эти фибриллярные отложения носят название “амилоидных фибрилл”. Патогенетические особенности нейродегенеративного процесса зависят от ряда факторов: образуются ли агрегированные белки внутри или за пределами клеток, какая часть клеток продуцирует белки с нарушенной конформацией, а также область мозга, в которой локализуются эти агрегаты [4].

Имеющиеся на сегодняшний день данные указывают на то, что несмотря на различия в аминокислотных последовательностях, белки, участвующие в нейродегенеративных процессах, в агрегированных формах имеют похожую структуру [44]. Структурная гомология белков, вовлеченных в нейродегенеративный процесс, в нативной форме может быть незначительной или отсутствовать, но вторичная структура их агрегатов может быть сходной. Большинство агрегатов богато β-складчатыми листами, в то время как их нормальные функциональные формы, в основном, являются α-спиралями и глобулярными структурами [10].

Болезнь Альцгеймера. Болезнь Альцгеймера (БА) является самым частым нейродегенеративным заболеванием в мире и самой распространенной формой деменции. Самым значимым фактором риска развития БА является возраст: показатели распространенности заболевания удваиваются каждые 5 лет после 65 лет [45].

Классическая клиническая картина заболевания включает прогрессирующие мнестические и эмоционально-аффективные нарушения, нарушения абстрактного мышления, концентрации внимания и снижение критики к собственному состоянию. В терминальной стадии заболевания наряду с деменцией наблюдается потеря веса, судороги, повышенная сонливость и отсутствие контроля над функциями тазовых органов, присоединение вторичных инфекционных процессов.

Структурные изменения в головном мозге при БА включают диффузную атрофию вещества го-

ловного мозга, особенно лобных долей и гиппокампов, с дегенерацией холинергических нейронов. Наблюдается увеличение желудочковых пространств, грануло-вакуолярная дегенерация и распространенный синаптический коллапс. Однако ключевой характеристикой БА является обнаружение церебральных бляшек, образованных белками с нарушенной третичной структурой. Гиперфосфорилированный тау-белок образует агрегаты в виде нейрофибриллярных клубков (neurofibrillary tangles, NFT), в то время как β-амилоид (Aβ) образует β-амилоидные бляшки. Образование церебральных бляшек и атрофия начинаются преимущественно в гиппокампе и медиальной височной доле. Накопление белков с нарушенной третичной структурой приводит к окислительному стрессу и развитию воспалительного ответа, который еще больше усугубляет прогрессирование нейродегенерации. У пациентов на поздней стадии БА также могут быть обнаружены агрегаты α-синуклеина, но данная находка обычно является вторичным признаком и по локализации ограничивается миндалевидным телом. Кроме того, при БА наблюдается прогрессирующая дегенерация нейронов в базальных ядрах, голубом пятне и ядрах шва, что соответствует потере холинергических, норадренергических и серотонинергических нейронов [46].

Большинство случаев БА связаны с аномалиями в генах белка-предшественника амилоида (amyloid precursor protein, APP), пресенилина-1, пресенилина-2 и аполипопротеина E4 (ApoE-ε4) [47]. Для БА областями головного мозга с преимущественным накоплением патологических белковых агрегатов являются височные и теменные доли, а также области лобной коры и поясной извилины [48].

Предполагается, что отложение Aβ в головном мозге является ключевым звеном патогенеза БА. В головном мозге пациентов с болезнью Альцгеймера отмечено повышение уровня различных провоспалительных цитокинов, таких как TNF-α, IFN-γ и интерлейкинов [49]. Увеличение концентрации провоспалительных цитокинов отмечается и в крови, и спинномозговой жидкости пациентов с болезнью Альцгеймера. Известно, что интерлейкины, в частности, IL-1β и IL-18, являются одними из причин развития процессов воспаления в центральной нервной системе, опосредуя экспрессию других провоспалительных генов [50]. IL-1β может продуцироваться многими типами клеток, включая макрофаги, микроглию и нейроны. Показано, что многие типы инфламмасом, в том числе NLRP1, NLRC4 и NLRP3, участвуют в опосредованном воспалением высвобождении IL-1β в ЦНС [51]. Aβ был первым белком с нарушенной третичной структурой, для которого была доказана способность активации воспаления в ЦНС. В частности, Aβ активирует каспазу-1 ли-

пополисахарид-праймированной микроглии, что приводит к высвобождению IL-1 β , причем эта реакция зависит от активации NLRP3 инфламماسомы Фагоцитоз фибрилл A β может вызывать разрыв эндосомы с последующим высвобождением катепсина В в цитозоль, что также является важным эндосомным сигналом для активации инфламماسомы NLRP3 [52].

Доказана связь между нейровоспалением и прогрессированием БА. Более высокий уровень IL-1 β в ЦНС может усугублять патогенез БА и влиять на синаптическую пластичность и долгосрочную потенциацию. Так, ингибирование IL-1 β приводит к положительному эффекту в виде торможения прогрессирования заболевания на моделях мышей с БА [53]. Активация NLRP3 инфламماسомы под действием A β в ЦНС необходима для расщепления каспазы-1, высвобождения IL-1 β и развития последующего воспалительного ответа, но окончательная роль активации NLRP3 при БА *in vivo* все еще не до конца ясна. Недавнее исследование, проведенное на модели мышей APP/PS1 с клинической картиной БА, показало, что активация инфламماسомы NLRP3 играет критическую роль в патогенезе БА. Так, у мышей, нокаутных по генам APP/PS1/NLRP3 и APP/PS1/caspase-1, отмечались значительно менее выраженные признаки нарушений пространственной памяти и других проявлений БА по сравнению с мышами APP/PS1. Дефицит NLRP3 снижает активацию каспазы-1 и секрецию IL-1 β и увеличивает клиренс A β . Кроме того, дефицит NLRP3 или каспазы-1 приводит к смещению активации микроглии в сторону M2-фенотипа, обладающего противовоспалительными свойствами [54]. Это согласуется с результатами другого исследования, показавшего, что ингибирование инфламماسомы NLRP3 цитохалазином D снижает классическую активацию микроглии при воздействии A β [55]. Было доказано, что активация инфламماسомы NLRP3 индуцирует приобретение микроглией провоспалительного M1-фенотипа и приводит к клиренсу A β ; в случае M2-фенотипа, уменьшается отложение A β и создаются благоприятные условия для синаптогенеза [56].

Следует отметить, что расщепление IL-1 β является лишь одним из аспектов активации инфламماسомы NLRP3. В частности, инфламماسома NLRP1 является одним из ключевых путей, ответственных за нейротоксичность A β . Показано, что экспрессия NLRP1 повышена у APP/PS1 мышей, причем это повышение уровня NLRP1 в нейронах ассоциировано с накоплением A β . Кроме того, увеличение экспрессии NLRP1 активирует сигнальный каскад каспазы-1 и приводит к пироптозу нейронов и высвобождению провоспалительных цитокинов [57]. Таким образом, несмотря на большой объем данных в пользу участия инфламماسом в патогенезе БА, природа взаимоотно-

шений между инфламмасомой NLRP3 и другими сигнальными путями, участвующими в патогенезе БА, требует уточнения.

Болезнь Паркинсона. Болезнь Паркинсона (БП) – второе по распространенности нейродегенеративное заболевание после БА, которым страдают около 10 миллионов человек во всем мире. БП, по данным многих исследований, является результатом гибели дофаминергических нейронов черной субстанции. Классические моторные симптомы БП включают брадиканезию, ригидность, тремор и постуральную неустойчивость. БП также свойственно множество немоторных симптомов, включая деменцию, отмечающуюся в 40% случаев [58].

Двумя гистопатологическими признаками БП являются накопление агрегатов белка α -синуклеина в тельцах Леви и потеря дофаминергических нейронов в черной субстанции [59]. α -Синуклеин представляет собой цитоплазматический белок, состоящий из 140 аминокислот, кодируемый геном SNCA. Он в большом количестве обнаруживается в мозге человека, а именно в нейронах неокортекса, гиппокампа, черной субстанции, таламуса и мозжечка. В более низких концентрациях α -синуклеин также присутствует в глиальных клетках. Предполагается, что в пресинаптических нервных окончаниях он взаимодействует с белками SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) и участвует в экзоцитозе нейромедиаторов. Цитозольный α -синуклеин изначально находится в “развернутом” состоянии, а при связывании с мембранами или везикулами принимает α -спиральную структуру. Взаимодействие α -синуклеина с липидными мембранами вызывает его конформационные изменения, и он специфически взаимодействует с липидными рафтами, богатыми холестерином и сфинголипидами [60]. В случае нарушения фолдинга α -синуклеин принимает богатую β -листами конформацию и начинает олигомеризоваться с другими молекулами α -синуклеина, которые впоследствии могут формировать фибриллы и нерастворимые тельца Леви [61].

Существует группа родственных нейродегенеративных заболеваний, связанных с неправильной укладкой и агрегацией α -синуклеина, которые называются α -синуклеинопатиями. К ним относятся БП, деменция с тельцами Леви и мультисистемная атрофия. Агрегаты α -синуклеина также были обнаружены в образцах ткани головного мозга при БА [61].

Фосфорилирование является наиболее распространенной посттрансляционной модификацией α -синуклеина, особенно по его сериновым и тирозиновым остаткам. Считается, что фосфорилирование α -синуклеина участвует в инициации нарушения фолдинга α -синуклеина. Убиквитинирование является вторым по распространенности

процессом посттрансляционной модификации и происходит по остаткам лизина, приводя к нарушению его локализации в клетке и избегания им деградации. Нитрование является еще одной формой посттрансляционной модификации, при которой остатки тирозина являются мишенями для присоединения нитрогрупп; этот процесс приводит к дисфункции митохондрий и апоптозу клетки [60].

Окислительный стресс может быть еще одним фактором агрегации α -синуклеина. При окислении дофамина происходит образование семихиноновых радикалов из его катехоловой части и продукты этих процессов окисляют α -синуклеин на поверхности синаптических везикул, приводя к его накоплению. Более того, α -синуклеин может образовывать трансмембранные каналы, приводящие к внутриклеточному избытку кальция и эксайтотоксичности [62].

Установлено, что воспалительный процесс играет решающую роль в патогенезе и прогрессировании БП. Было показано, что внеклеточный α -синуклеин захватывается нейрональными и микроглиальными клетками в культуре, хотя природа этого механизма все еще остается неясной. α -синуклеин высвобождается из клетки на ранних стадиях заболевания и, действуя как эндогенный сигнал, активирует микроглию с последующим высвобождением провоспалительных молекул, таких как TNF- α и IL-1 β , негативно влияющих на дофаминергические нейроны [63].

Получены данные в пользу участия активации NLRP3 инфламмосомы в α -синуклеин-опосредованной активации микроглии. В частности, фибриллярный α -синуклеин индуцирует синтез IL-1 β посредством TLR2-зависимого пути, а его фагоцитоз вызывает продукцию реактивных форм кислорода и высвобождение катепсина В в цитозоль, что приводит к активации NLRP3 инфламмосомы [64]. А β фибриллярные формы α -синуклеина способствуют увеличению высвобождения моноцитарного и микроглиального IL-1 β , опосредованного активацией каспазы-1 [65].

Активация инфламмосом классическими стимулами напрямую приводит к частичной деградации α -синуклеина путем расщепления каспазой-1. В ходе данного процесса увеличивается склонность α -синуклеина к агрегации и, соответственно, нейротоксичности. В то же время, при ингибировании каспазы-1, темпы гибели нейронов снижаются. Индуцированная α -синуклеином активация инфламмосом и опосредованная инфламмосомами деградация и последующая агрегация α -синуклеина могут приводить к формированию “порочного круга”, который в конечном счете вызывает увеличение концентрации провоспалительных цитокинов, количества агрегированного α -синуклеина и способствует гибели нейронов [66]. Потвержде-

нием нейропротективного эффекта ингибирования инфламмосом при БП является снижение фенольным флавоноидом байкалеином активации инфламмосом и апоптоз в дофаминергической системе черной субстанции у крыс [67].

Боковой амиотрофический склероз. Боковой амиотрофический склероз (БАС) является прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием, в основе которого лежит повреждение мотонейронов в двигательной коре, стволе головного мозга и спинном мозге. БАС характеризуется быстро прогрессирующей слабостью, атрофией и фасцикуляциями мышц, спастичностью, дизартрией, дисфагией и дыхательными нарушениями [68]. Неуклонно прогрессирующая клиническая картина является следствием дегенерации верхнего и нижнего мотонейронов. В процессе прогрессирования заболевания отмечается нарастание выраженности мышечных гипотрофий, потеря двигательных функций; вплоть до поздних стадий заболевания относительно интактными остаются сфинктеры мочевыводящих путей и глазодвигательные мышцы [69]. У части пациентов с БАС отмечаются когнитивные нарушения различной степени выраженности: от незначительных нарушений исполнительных функций и эмоционально-аффективных нарушений до деменции у пациентов с фенотипом “БАС-лобно-височная деменция” [68, 69]. Как и при многих других нейродегенеративных заболеваниях, в патогенезе БАС ключевые роли играют процессы эксайтотоксичности, митохондриальная дисфункция, окислительный стресс, нарушение энергетического обмена и нейровоспаление [70].

Белком, ответственным за наиболее распространенную форму семейного БАС, является супероксиддисмутаза (SOD1), а наиболее распространенной мутацией является вариант мутации в гене *SOD1*, известный как A4V [69]. Супероксиддисмутаза является Cu/Zn-металлоферментом, который служит антиоксидантом для превращения супероксид-радикалов в O₂ и H₂O₂. Как и в случае с геном *APP* при БА, ген *SOD1* также находится на 21 хромосоме. Исследования на моделях мышей показывают, что SOD1 обладает проапоптотическими функциями, и к развитию нейродегенеративного процесса приводит усиление токсических свойств мутантного белка SOD1, а не потеря функции SOD1 [68, 69]. Тем не менее, точная роль SOD1 в патогенезе БАС все еще окончательно не определена, хотя мутации в гене приводят к неправильной укладке транслируемого белка и его последующей агрегации. Агрегация белка SOD1 является общим патологическим признаком как семейных, так и спорадических форм БАС. Мутантный белок SOD1 по своей природе нестабилен и образует цитоплазматические агрегаты, которые, как полагают, накапливаются и повреждают митохондрии, протеасомы,

шапероны и другие белки [68, 69]. Наличие мутантного *SOD1* ассоциировано с дисфункцией транспортера возбуждающих аминокислот 2 типа (excitatory amino acid transporter 2, EAAT2), расположенного на пресинаптической мембране и ответственного за элиминацию глутамата из синаптической щели. Снижение количества EAAT2 также отмечено в аутопсийных образцах ткани головного и спинного мозга пациентов с БАС [71]. Таким образом, нарушение нормальной работы EAAT2 приводит к повышению уровня глутамата в синаптической щели, и, как следствие, эксайтотоксичности.

Убиквитиновые включения (УВ) являются наиболее распространенным типом включений, обнаруживаемым в головном мозге почти 100% пациентов с БАС. УВ обнаруживаются в мотонейронах ствола головного мозга и спинного мозга, а также в мотонейронах височных и лобных долей неокортекса. УВ состоят из убиквитина, периферина, Cu/Zn-супероксиддисмутазы и дорфина. ДНК-связывающий белок-43 (TDP-43), представляющий собой ядерный белок, участвующий в процессинге РНК, также был обнаружен в составе УВ [72]. Белок FUS и тельца Буниной также содержатся в мотонейронах ствола головного мозга и спинного мозга. FUS также является ядерным белком, участвующим в процессинге РНК. В нейронах моторной коры могут обнаруживаться включения, преимущественно состоящие из промежуточных филаментов, включая гиперфосфорилированные нейрофиламенты и периферин. Считается, что кроме вышеперечисленных соединений, в патогенезе БАС могут играть роль следующие белки: геликаза сенатаксин (*senataxin*, *SETX*) – белок, участвующий в процессинге РНК; алсин (*alsin*, *ALS2*) – фактор обмена гуаниновых нуклеотидов, участвующий в перемещении эндосом, и динактин – часть моторного комплекса динеина, связывающий микротрубочки и участвующий в клеточном транспорте [69]. Показано, что механизмы врожденного иммунитета могут участвовать в активации микроглии [73]. Активация этих клеток врожденного иммунитета приводит к выработке провоспалительных нейротоксических цитокинов, таких как IL-1 β и IL-18, которые в дальнейшем способствуют гибели мотонейронов [74].

Мутации в гене *SOD1* были первыми идентифицированными мутациями при семейных формах БАС и по настоящий день являются наиболее изученными [75]. Мутация *SOD1G93A* используется для создания трансгенных мышей *SOD1G93A*, – показано, что она снижает стабильность фолдинга белка *SOD1* и вызывает образование белковых агрегатов [69]. Как уже было упомянуто выше, характеристикой белковых агрегатов у пациентов с БАС также является присутствие белка TDP-43, который, как считается, перемещается из ядра

клетки в цитоплазму [76]. Мутации в гене *TDP-43* (например, TDP-43Q331K) приводят к развитию семейных форм БАС [77], а у трансгенных мышей TDP-43Q331K повышается активация микроглии и дегенерация двигательных нейронов [78].

Белковые агрегаты при БАС являются мощными триггерами иммунного ответа, опосредованного микроглией [74]. Ключевым компонентом врожденной иммунной системы, активируемым белковыми агрегатами, является инфламмасома NLRP3 [64].

Активация инфламмасом и повышение уровня концентрации их компонентов наблюдаются у пациентов с БАС, а также на моделях животных с БАС [79], при этом каспаза-1 и IL-1 β играют важную роль в патогенезе заболевания. [74]. Несмотря на это, Johann и соавт. было показано, что микроглия мышей *SOD1G93A* и пациентов с БАС не экспрессирует инфламмасому NLRP3 [79]. Кроме того, на мышинных моделях было продемонстрировано, что *SOD1G93A*-опосредованная активация каспазы-1 и продукция IL-1 β в микроглии происходит независимо от NLRP3 инфламмасомы [74].

Предполагается, что в клетках микроглии мутантный ген *SOD1-G93A* посредством ASC-адаптерного протеина и NLRP3 активирует каспазу-1, тем самым приводя к последующему высвобождению IL-1 β и провокации воспалительного ответа. Свободные формы кислорода и пероксинитрит также могут способствовать развитию этого сигнального каскада [80].

При исследовании трансгенных животных с генетической абляцией каспазы-1 и IL-1 β было отмечено увеличение показателей их выживаемости, снижение активации астроцитов и микроглии, а также темпов гибели мотонейронов в передних рогах спинного мозга. В этой же модели *in vivo*, применение анти-IL-1 антител оказывало положительный эффект на показатели выживаемости животных [74].

При исследовании цитокинового профиля цереброспинальной жидкости больных спорадической формой БАС было выявлено повышение уровня общего IL-18, его ингибитора IL-18-связывающего белка (IL-18BP) и свободного IL-18, что, вероятно, может быть связано с активацией инфламмасом, участвующих в созревании этих интерлейкинов [81]. Эта гипотеза подтверждается повышенным содержанием NLRP3, ASC, каспазы-1 и зрелого IL-18 в ткани спинного мозга при спорадическом БАС [79].

ИНФЛАММАСОМЫ КАК МИШЕНИ ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Связь инфламмасом, в частности, инфламмасомы NLRP3, с множеством патологических про-

цессов в ЦНС вызывает значительный интерес в контексте разработки эффективных методов контроля их активности. С учетом сложного сигнального каскада инфламмасом NLRP3, можно предположить широкий спектр мишеней для их ингибирования. Например, могут быть предложены следующие стратегии:

- подавление активирующих сигналов;
- блокада сборки инфламмасом;
- ингибирование активации каспазы-1;
- блокада расщепления порообразующего белка газдермина D;
- нейтрализация провоспалительных цитокинов, продуцируемых инфламмасомой NLRP3;
- ингибирование рецептора P2X;
- ингибирование оттока K^+ из клетки и АТФ-связывающего домена NLRP3 [82].

Малые молекулы – ингибиторы NLRP3. Соединения с фрагментом сульфонилмочевины могут специфически ингибировать активацию инфламмасы NLRP3 в фазе активации, не влияя на стадию прайминга, зависящую от передачи сигналов NF- κ B [83]. *Глибурид* был первым идентифицированным препаратом, содержащим фрагмент сульфонилмочевины, который проявлял ингибирующую активность в отношении NLRP3 *in vitro*, однако доза, необходимая для достижения терапевтического эффекта *in vivo*, приводит к развитию выраженной гипогликемии. Было показано, что низкомолекулярное соединение MCC950, имеющее сходство с сульфонилмочевиной, блокирует индуцированную NLRP3 олигомеризацию ASC, что делает его высокоэффективным и селективным ингибитором NLRP3. Это вещество приводило к снижению выраженности воспалительного ответа на мышинных моделях экспериментального аллергического энцефаломиелита и *ex vivo* человеческих образцах, но его эффект при других неврологических патологиях не исследовался [83].

Кроме того, один из промежуточных субстратов в синтезе глибурида, *16673-34-0*, не оказывает влияния на метаболизм глюкозы и, как было продемонстрировано, улучшает реперфузию на моделях ишемии миокарда за счет ингибирования образования инфламмасы NLRP3 [84].

Кетоновый метаболит β -гидроксибутират (β -hydroxybutyrate, ВНВ) подавляет активацию инфламмасы NLRP3 путем ингибирования олигомеризации NLRP3-ASC. В эксперименте показано, что ВНВ снижает отток K^+ из клетки и реакцию эндоплазматического ретикулаума [85]. Кроме того, ВНВ может проникать через гематоэнцефалический барьер в паренхиму мозга и оказывать нейрорепроторный эффект при некоторых патологических состояниях [86]. Было обнаружено, что антагонист лейкотриеновых рецепторов цистеи-

нил предотвращает активацию каспазы-1 посредством прямого ингибирования олигомеризации ASC [83].

INF4E является недавно синтезированным соединением, которое напрямую ингибирует АТФазу NLRP3 и специфически подавляет активацию NLRP3 инфламмасы, что было также продемонстрировано на мышинных моделях ишемии миокарда, однако требует дополнительного изучения в контексте неврологической патологии [87].

3,4-Метилendioкси- β -нитростирол (3,4-methylenedioxy- β -nitrostyrene, MNS) – представляет собой новый ингибитор тирозинкиназы, специфически и эффективно ингибирующий инфламмасому NLRP3, напрямую воздействуя на NOD и LRR домены [88]. Согласно недавнему исследованию, MNS предотвращал прогрессирование раневого процесса и улучшал заживление в экспериментальной модели ожога [89]. Выраженный положительный эффект и небольшая цитотоксичность делают MNS привлекательным кандидатом для исследований в терапии неврологических заболеваний, однако каких-либо данных в отношении его эффекта в ЦНС в литературе не представлено [90].

Анти-IL-1 терапия. В настоящее время анти-IL-1 терапия, включающая антагонисты рецептора интерлейкина-1 (IL-1Ra), такие как анакинра, и специфические моноклональные антитела, такие как канакинумаб, одобрена для использования у пациентов с аутоиммунными заболеваниями [91]. Введение антагонистов IL-1R уменьшает ишемическое повреждение головного мозга на модели инсульта у мышей, однако наличие долгосрочных положительных эффектов от такой терапии подвергается сомнению. Считается, что антагонист рецептора IL-1 анакинра преимущественно эффективен при неврологических проявлениях криопирин-ассоциированного периодического синдрома вследствие хорошего проникновения через ГЭБ. Несмотря на свою эффективность, анти-IL-1 препараты не могут привести к эффективному торможению всех процессов, ассоциированных с активацией инфламмасы. Тем не менее, пути, опосредованные каспазой-1, такие как пироптоз, также способствуют прогрессированию патологического процесса; по этой причине прямая блокада активации инфламмасы может быть более эффективным методом контроля процессов воспаления по сравнению с нейтрализацией продуктов их деятельности [92].

Другие соединения, воздействующие на специфические пути. Противомаларийный препарат артемизинин оказывает противовоспалительное действие за счет ингибирования сигнального пути NF- κ B. На модели трансгенных мышей с БА было показано, что терапия артемизинином сни-

жает активность NLRP3 инфламмасом. Тем не менее, артемизинин имеет ряд побочных эффектов, связанных с его нейротоксичностью, кардиотоксичностью, эмбриотоксичностью; при его длительном применении возможно развитие аллергических реакций [93].

АТФ-зависимый рецептор также участвует в активации NLRP3 инфламмасы [94]. Применение его антагониста *бриллиантового синего G* (brilliant blue G, BBG) уменьшало выраженность воспаления и уменьшало выраженность неврологической симптоматики на моделях субарахноидального кровоизлияния у грызунов [95]. BBG может проникать через ГЭБ при относительно низких его концентрациях в крови. Использование антагонистов P2X7R является спорным, поскольку эти рецепторы локализируются в различных типах клеток и могут вызывать нежелательные эффекты вне целевой мишени [96].

Пробенцид, препарат для лечения подагры и гиперурикемии, является специфическим блокатором каналов паннексина-1 [97]. Он способен подавлять активацию NLRP3 в культивируемых нейронах и астроцитах, обеспечивая высокую внеклеточную концентрацию K^+ и снижая экспрессию каспазы-1 в мозге крыс [98].

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), включая флуфенамовую и мефенамовую кислоты, обладают нейропротективным действием в моделях БА на грызунах. Они избирательно ингибируют инфламмасому NLRP3, блокируя VRAC-каналы в макрофагах [99]. Действие этих НПВП направлено как на VRAC/NLRP3, так и на циклооксигеназу, что делает их более эффективными, чем препараты, ингибирующие лишь один провоспалительный путь.

Посттрансляционные модификации белков NLRP3 и других составляющих инфламмасы NLRP3 считаются важными звеньями процесса ее созревания. Можно предположить, что перспективным направлением исследований в области терапии нейродегенеративных заболеваний является разработка методов модуляции посттрансляционных модификаций с целью ингибирования активности инфламмасы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Длительное время считалось, что процессы нейровоспаления играют ключевую роль лишь в патогенезе аутоиммунных заболеваний нервной системы. В настоящее время накоплен достаточный объем экспериментальных, эпидемиологических, генетических и эпигенетических данных, позволяющий предполагать непосредственное участие механизмов врожденного иммунитета в развитии нейродегенеративных заболеваний. Важной частью этих механизмов является активация

инфламмасы, которые участвуют в возникновении, поддержании и хронизации иммунного ответа. Исследование особенностей активации инфламмасы на моделях БА, БП, БАС и других нейродегенеративных заболеваний позволяет предложить потенциальные терапевтические мишени для эффективного ингибирования этого иммунного сигнального механизма.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Внешнее финансирование отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dobson C.M. // *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2004. V. 15. № 1. P. 3–16.
2. Lee S., Tsai F.V. // *J. Biochem. Mol. Biol.* 2005. V. 38. № 3. P. 259–65.
3. Hekmatimoghaddam S., Zare-Khormizy M.R., Pourrajab F. // *Biofactors.* 2017. V. 43. № 6. P. 737–759.
4. Gandhi J., Antonelli A.P., Afridi A., Vatsia S., Joshi G., Romanov V., Murray I.V.J., Khan S.A. // *Rev. Neurosci.* 2019. V. 30. № 4. P. 339–358.
5. Hartl F.U. *Protein Misfolding Diseases* // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. V. 86. P. 21–26.
6. Karbowski M., Neutzner A. // *Acta Neuropathol.* 2012. V. 123. № 2. P. 157–71.
7. Gu Z., Nakamura V., Lipton S.A. // *Mol. Neurobiol.* 2010. V. 41. № 2–3. P. 55–72.
8. Torres M., Encina G., Soto P., Hetz P. // *Commun. Integr. Biol.* 2011. V. 4. № 3. P. 258–61.
9. Vaquer-Alicea J., Diamond M.I. // *Annu. Rev. Biochem.* 2019. V. 88. P. 785–810.
10. Soto P. // *Nature Reviews Neuroscience.* 2003. V. 4. № 1. P. 49–60.
11. Wyss-Coray V., Mucke L. // *Neuron.* 2002. V. 35. № 3. P. 419–32.
12. Kempuraj D., Thangavel R., Natteru P.A., Selvakumar G.P., Saeed D., Zahoor H., Zaheer S., Iyer S.S., Zaheer A. // *J. Neurol. Neurosurg. Spine.* 2016. V. 1. № 1.
13. Stephenson J., Nutma E., van der Valk P., Amor S. // *Immunology.* 2018. V. 154. № 2. P. 204–219.
14. Lill P.M., Rengmark A., Pihlström L., Fogh I., Shatunov A., Sleiman P.M., Wang L.S., Liu V., Lassen P.F., Meissner E., Alexopoulos P., Calvo A., Chio A., Dizdar N., Faltraco F., Forsgren L., Kirchheiner J., Kurz A., Larsen J.P., Liebsch M., Linder J., Morrison K.E., Nissbrandt H., Otto M., Pahnke J., Partch A., Restagno G., Rujescu D., Schnack P., Shaw P.E., Shaw P.J., Tumani H., Tysnes O.B., Valladares O., Silani V., van den Berg L.H., van Rheenen W., Veldink J.H., Lindenberger U., Steinhagen-Thiessen E., Teipel S., Pernecký R., Hakonarson H., Hampel H., von Arnim P.A.F., Olsen J.H., Van Deerlin V.M., Al-Chalabi A.,

- Toft M., Ritz B., Bertram L. // *Alzheimers Dement.* 2015. V. 11. № 12. P. 1407–1416.
15. Sica A., Mantovani A. // *J. Clin. Inves.* 2012. V. 122. № 3. P. 787–95.
 16. Wes P.D., Holtman I.R., Boddeke E.W., Möller V., Eggen B.J. // *Glia.* 2016. V. 64. № 2. P. 197–213.
 17. Liddelov S.A., Barres B.A. // *Immunity.* 2017. V. 46. № 6. P. 957–967.
 18. Vilalta A., Brown G.P. // *FEBS J.* 2018. V. 285. № 19. P. 3566–3575.
 19. Peferoen L., Kipp M., van der Valk P., van Noort J.M., Amor S. // *Immunology.* 2014. V. 141. № 3. P. 302–313.
 20. Sulzer D., Alcalay R.N., Garretti F., Cote L., Kanter E., Agin-Liebes J., Liang P., McMurtry P., Hildebrand W.H., Mao X., Dawson V.L., Dawson V.M., Oseroff P., Pham J., Sidney J., Dillon M.B., Carpenter P., Weiskopf D., Phillips E., Mallal S., Peters B., Frazier A., Lindestam Arlehamn P.S., Sette A. // *Nature.* 2017. V. 546. № 7660. P. 656–661.
 21. Beers D.R., Zhao W., Wang J., Zhang X., Wen S., Neal D., Thonhoff J.R., Alsuliman A.S., Shpall E.J., Rezvani K., Appel S.H. // *JCI Insign.* 2017. V. 2. № 5. P. e89530.
 22. Martinon F., Burns K., Tschopp J. // *Molecular Cell.* 2002. V. 10. № 2. P. 417–426.
 23. Broz P., Dixit V.M. // *Nature Reviews Immunology.* 2016. V. 16. № 7. P. 407–420.
 24. Lieberman J., Wu H., Kagan J.P. // *Science Immunology.* 2019. V. 4. № 39. P. eaav1447.
 25. Walsh J.G., Muruve D.A., Power P. // *Nature Reviews Neuroscience.* 2014. V. 15. № 2. P. 84–97.
 26. Guo H., Callaway J.B., Ting J.P. // *Nature Medicine.* 2015. V. 21. № 7. P. 677–687.
 27. Minkiewicz J., de Rivero Vaccari J., Keane R. // *J. Immunol.* 2012. V. 188 (1 Supplement). 54.12.
 28. Faustin B., Lartigue L., Bruey J.-M., Luciano F., Sergienko E., Bailly-Maitre B., Volkmann N., Hanein D., Rouiller I., Reed J.P. // *Molecular Cell.* 2007. V. 25. № 5. P. 713–724.
 29. Bauernfeind F.G., Horvath G., Stutz A., Alnemri E.S., MacDonald K., Speert D., Fernandes-Alnemri V., Wu J., Monks B.G., Fitzgerald K.A. // *The Journal of Immunology.* 2009. V. 183. № 2. P. 787–791.
 30. Yang J., Liu Z., Xiao V.S. // *Cellular & Molecular Immunology.* 2017. V. 14. № 1. P. 65–79.
 31. Muñoz-Planillo R., Kuffa P., Martínez-Colón G., Smith B.L., Rajendiran V.M., Núñez G. // *Immunity.* 2013. V. 38. № 6. P. 1142–1153.
 32. Mangan M.S., Olhava E.J., Roush W.R., Seidel H.M., Glick G.D., Latz E. // *Nature Reviews Drug Discovery.* 2018. V. 17. № 8. P. 588–606.
 33. Casson P.N., Copenhaver A.M., Zwack E.E., Nguyen H.V., Strowig V., Javdan B., Bradley W.P., Fung V.P., Flavell R.A., Brodsky I.E. // *PLoS Pathogens.* 2013. V. 9. № 6. P. e1003400.
 34. Chu L. H., Indramohan M., Ratsimandresy R.A., Gan-gopadhyay A., Morris E.P., Monack D.M., Dorfleutner A., Stehlik P. // *Nature Communications.* 2018. V. 9. № 1. P. 1–16.
 35. Schmid-Burgk J.L., Gaidt M.M., Schmidt V., Ebert V.S., Bartok E., Hornung V. // *European Journal of Immunology.* 2015. V. 45. № 10. P. 2911–2917.
 36. Oroz J., Barrera-Vilarmau S., Alfonso P., Rivas G., de Alba E. // *Journal of Biological Chemistry.* 2016. V. 291. № 37. P. 19487–19501.
 37. Gaidt M.M., Ebert V.S., Chauhan D., Schmidt V., Schmid-Burgk J.L., Rapino F., Robertson A.A., Cooper M.A., Graf V., Hornung V. // *Immunity.* 2016. V. 44. № 4. P. 833–846.
 38. Alboni S., Cervia D., Sugama S., Conti B. // *Journal of Neuroinflammation.* 2010. V. 7. № 1. P. 1–12.
 39. John G.R., Lee S.P., Song X., Rivieccio M., Brosnan P.F. // *Glia.* 2005. V. 49. № 2. P. 161–176.
 40. Bergsbaken V., Fink S.L., Cookson B.V. // *Nature Reviews Microbiology.* 2009. V. 7. № 2. P. 99–109.
 41. Siu K. L., Yuen K.S., Castaño-Rodríguez P., Ye Z.W., Yeung M.L., Fung S.Y., Yuan S., Chan P.P., Yuen K.Y., Enjuanes L., Jin D.Y. // *FEBS J.* 2019. V. 33. № 8. P. 8865–8877.
 42. Sats H., Özger H.S., Aysert Yıldız P., Hızal K., Gulbahar Ö., Erbaş G., Aygencel G., Guzel Tunccan O., Öztürk M.A., Dizbay M., Tufan A. // *Cytokine.* 2021. V. 137. P. 155302.
 43. Heneka M.V., Golenbock D., Latz E., Morgan D., Brown R. // *Alzheimer's Research & Therapy.* 2020. V. 12. № 1. P. 1–3.
 44. Kaye D., Head E., Thompson J.L., McIntire V.M., Milton S.P., Cotman P.W., Glabe P.G. // *Science.* 2003. V. 300. № 5618. P. 486–489.
 45. Ziegler-Graham K., Brookmeyer R., Johnson E., Arri-ghi H.M. // *Alzheimers Dement.* 2008. V. 4. № 5. P. 316–23.
 46. DeTure M.A., Dickson D.W. // *Mol. Neurodegener.* 2019. V. 14. № 1. P. 32.
 47. Lanoiselée H.-M., Nicolas G., Wallon D., Rovelet-Lec-rux A., Lacour M., Rousseau S., Richard A.-P., Pasquier F., Rollin-Sillaire A., Martinaud O. // *PLoS Medicine.* 2017. V. 14. № 3. P. e1002270.
 48. Wenk G.L. // *Journal of Clinical Psychiatry.* 2003. V. 64. P. 7–10.
 49. Johnston H., Boutin H., Allan S.M. // *Biochem. Soc. Trans.* 2011. V. 39. № 4. P. 886–890.
 50. Rubio-Perez J.M., Morillas-Ruiz J.M. // *ScientificWorldJournal.* 2012. V. 2012. P. 756357.
 51. Trendelenburg G. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2008. V. 28. № 5. P. 867–881.
 52. Halle A., Hornung V., Petzold G.P., Stewart P.R., Monks B.G., Reinheckel V., Fitzgerald K.A., Latz E., Moore K.J., Golenbock D.V. // *Nat. Immunol.* 2008. V. 9. № 8. P. 857–865.
 53. Kitazawa M., Cheng D., Tsukamoto M.R., Koike M.A., Wes P.D., Vasilevko V., Cribbs D.H., LaFerla F.M. // *J. Immunol.* 2011. V. 187. № 12. P. 6539–6549.
 54. Heneka M.V., Kummer M.P., Stutz A., Delekate A., Schwartz S., Vieira-Saecker A., Griep A., Axt D., Remus A., Tzeng V.P., Gelpi E., Halle A., Korte M., Latz E., Golenbock D.V. // *Nature.* 2013. V. 493. № 7434. P. 674–678.
 55. Shi F., Yang L., Kouadir M., Yang Y., Wang J., Zhou X., Yin X., Zhao D. // *J. Neuroinflammation.* 2012. V. 9. P. 73.
 56. Shi F., Yang L., Wang J., Kouadir M., Yang Y., Fu Y., Zhou X., Yin X., Zhao D. // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai).* 2013. V. 45. № 11. P. 973–978.

57. *Tan M.S., Tan L., Jiang V., Zhu X.P., Wang H.F., Jia P.D., Yu J.V.* // Cell Death Dis. 2014. V. 5. № 8. P. e1382.
58. *Shulman J.M., De Jager P.L., Feany M.B.* // Annu. Rev. Pathol. 2011. V. 6. P. 193–222.
59. *Gibb W.R., Lees A.J.* // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1988. V. 51. № 6. P. 745–752.
60. *Kim W.S., Kågedal K., Halliday G.M.* // Alzheimers Res. Ther. 2014. V. 6. № 5. P. 73.
61. *Sulzer D.* // Mov. Disord. 2010. V. 25. Suppl 1. P. S27–S31.
62. *Tsigelny I.F., Sharikov Y., Wrasidlo W., Gonzalez V., Desplats P.A., Crews L., Spencer B., Masliah E.* // FEBS J. 2012. V. 279. № 6. P. 1000–1013.
63. *Littelljohn D., Mangano E., Clarke M., Bobyn J., Moloney K., Hayley S.* // Parkinsons Dis. 2010. V. 2011. P. 713517.
64. *Codolo G., Plotegher N., Pozzobon V., Brucale M., Tessari I., Bubacco L., de Bernard M.* // PLoS One. 2013. V. 8. № 1. P. e55375.
65. *Gustot A., Gallea J.I., Sarroukh R., Celej M.S., Ruyschaert J.M., Raussens V.* // Biochem J. 2015. V. 471. № 3. P. 323–333.
66. *Wang W., Nguyen L.V., Burlak P., Chegini F., Guo F., Chataway V., Ju S., Fisher O.S., Miller D.W., Datta D., Wu F., Wu P.X., Landeru A., Wells J.A., Cookson M.R., Boxer M.B., Thomas P.J., Gai W.P., Ringe D., Petsko G.A., Hoang Q.Q.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2016. V. 113. № 34. P. 9587–9592.
67. *Hung K.P., Huang H.J., Wang Y.V., Lin A.M.* // J. Ethnopharmacol. 2016. V. 194. P. 522–529.
68. *Kiernan M.P., Vucic S., Cheah B.P., Turner M.R., Eisen A., Hardiman O., Burrell J.R., Zoing M.P.* // Lancet. 2011. V. 377. № 9769. P. 942–955.
69. *Pasinelli P., Brown R.H.* // Nat. Rev. Neurosci. 2006. V. 7. № 9. P. 710–723.
70. *Turner M.R., Bowser R., Bruijn L., Dupuis L., Ludolph A., McGrath M., Manfredi G., Maragakis N., Miller R.G., Pullman S.L., Rutkove S.B., Shaw P.J., Shefner J., Fischbeck K.H.* // Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener. 2013. V. 14. Suppl 1. № 0 1. P. 19–32.
71. *Rothstein J.D., Van Kammen M., Levey A.I., Martin L.J., Kuncl R.W.* // Ann. Neurol. 1995. V. 38. № 1. P. 73–84.
72. *Gordon P.H.* // Aging Dis. 2013. V. 4. № 5. P. 295–310.
73. *Brites D., Vaz A.R.* // Front. Cell. Neurosci. 2014. V. 8. P. 117.
74. *Meissner F., Molawi K., Zychlinsky A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2010. V. 107. № 29. P. 13046–13050.
75. *Rosen D.R., Siddique V., Patterson D., Figlewicz D.A., Sapp P., Hentati A., Donaldson D., Goto J., O'Regan J.P., Deng H.X. et al.* // Nature. 1993. V. 362. № 6415. P. 59–62.
76. *Barmada S.J., Finkbeiner S.* // Rev. Neurosci. 2010. V. 21. № 4. P. 251–272.
77. *Sreedharan J., Blair I.P., Tripathi V.B., Hu X., Vance P., Rogelj B., Ackerley S., Durnall J.P., Williams K.L., Buratti E., Baralle F., de Belleroche J., Mitchell J.D., Leigh P.N., Al-Chalabi A., Miller P.P., Nicholson G., Shaw P.E.* // Science. 2008. V. 319. № 5870. P. 1668–1672.
78. *Lee J.D., Levin S.P., Willis E.F., Li R., Woodruff V.M., Noakes P.G.* // Journal of Neuroinflammation. 2018. V. 15. № 1. P. 171.
79. *Johann S., Heitzer M., Kanagaratnam M., Goswami A., Rizo V., Weis J., Troost D., Beyer P.* // Glia. 2015. V. 63. № 12. P. 2260–2273.
80. *Bellezza I., Grottelli S., Costanzi E., Scarpelli P., Pigna E., Morozzi G., Mezzasoma L., Peirce M. J., Moresi V., Adamo S., Minelli A.* // Mol. Neurobiol. 2018. V. 55. № 3. P. 2350–2361.
81. *Italiani P., Carlesi P., Giungato P., Puxeddu I., Borroni B., Bossù P., Migliorini P., Siciliano G., Boraschi D.* // J Neuroinflammation. 2014. V. 11. P. 94.
82. *Jiang H., He H., Chen Y., Huang W., Cheng J., Ye J., Wang A., Tao J., Wang P., Liu Q., Jin V., Jiang W., Deng X., Zhou R.* // J. Exp. Med. 2017. V. 214. № 11. P. 3219–3238.
83. *Coll R.P., Robertson A.A., Chae J.J., Higgins S.P., Muñoz-Planillo R., Inserra M.P., Vetter I., Dungan L.S., Monks B.G., Stutz A., Croker D.E., Butler M.S., Haneklaus M., Sutton P.E., Núñez G., Latz E., Kastner D.L., Mills K.H., Masters S.L., Schroder K., Cooper M.A., O'Neill L.A.* // Nat Med. 2015. V. 21. № 3. P. 248–255.
84. *Marchetti P., Chojnacki J., Toldo S., Mezzaroma E., Tranchida N., Rose S. W., Federici M., Van Tassell B.W., Zhang S., Abbate A.* // J. Cardiovasc. Pharmacol. 2014. V. 63. № 4. P. 316–322.
85. *Youm Y.H., Nguyen K.Y., Grant R.W., Goldberg E.L., Bodogai M., Kim D., D'Agostino D., Planavsky N., Lupfer P., Kanneganti V.D., Kang S., Horvath V.L., Fahmy V.M., Crawford P.A., Biragyn A., Alnemri E., Dixit V.D.* // Nat. Med. 2015. V. 21. № 3. P. 263–269.
86. *Song L., Pei L., Yao S., Wu Y., Shang Y.* // Front. Cell. Neurosci. 2017. V. 11. P. 63.
87. *Mastrocola R., Penna P., Tullio F., Femminò S., Nigro D., Chiazza F., Serpe L., Collotta D., Alloati G., Cocco M., Bertinaria M., Pagliaro P., Aragno M., Collino M.* // Oxid. Med. Cell. Longev. 2016. V. 2016. P. 5271251.
88. *He Y., Varadarajan S., Muñoz-Planillo R., Burberry A., Nakamura Y., Núñez G.* // J. Biol. Chem. 2014. V. 289. № 2. P. 1142–50.
89. *Xiao M., Li L., Li P., Liu L., Yu Y., Ma L.* // Plast. Reconstr. Surg. 2016. V. 137. № 3. P. 566e–575e.
90. *Hsieh P.-W., Chang Y.-V., Chuang W.Y., Shih H.-P., Chiang S.-Z., Wu P.-P.* // Bioorganic & Medicinal Chemistry. 2010. V. 18. № 21. P. 7621–7627.
91. *Kuemmerle-Deschner J.B., Gautam R., George A.V., Raza S., Lomax K.G., Hur P.* // RMD Open. 2020. V. 6. № 2. P. e001227.
92. *Venugopal J., Wang J., Mawri J., Guo P., Eitzman D.* // Haematologica. 2021. V. 106. № 9. P. 2469–2477.
93. *Shi J.Q., Zhang P.P., Sun X.L., Cheng X.X., Wang J.B., Zhang Y.D., Xu J., Zou H.Q.* // CNS Neurosci Ther. 2013. V. 19. № 4. P. 262–268.
94. *Deplano S., Cook H.V., Russell R., Franchi L., Schneiter S., Bhangal G., Unwin R.J., Pusey P.D., Tam F.W., Behmoaras J.* // J. Leukoc. Biol. 2013. V. 93. № 1. P. 127–134.

95. Zhou X., Yang Y., Wu L., Wang Y., Du P., Li P., Wang Z., Wang Y. // *Med. Sci. Moni.* 2019. V. 25. P. 6359–6366.
96. Fischer W., Franke H., Krügel U., Müller H., Dinkel K., Lord B., Letavic M.A., Henshall D.P., Engel V. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 6. P. e0156468.
97. Silverman W.R., de Rivero Vaccari J.P., Locovei S., Qiu F., Carlsson S.K., Scemes E., Keane R.W., Dahl G. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 27. P. 18143–18151.
98. Mawhinney L.J., de Rivero Vaccari J.P., Dale G.A., Keane R.W., Bramlett H.M. // *BMC Neuroscience.* 2011. V. 12. № 1. P. 123.
99. Daniels M.J.D., Rivers-Auty J., Schilling V., Spencer N.G., Watremez W., Fasolino V., Booth S.J., White P.S., Baldwin A.G., Freeman S., Wong R., Latta P., Yu S., Jackson J., Fischer N., Kozziel V., Pillot V., Bagnall J., Allan S.M., Paszek P., Galea J., Harte M.K., Eder P., Lawrence P.B., Brough D. // *Nature Communications.* 2016. V. 7. № 1. P. 12504.

The Role of Inflammasomes in the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases

D. V. Shevchuk^a, A. A. Abramova^a, and M. N. Zakharova^a

^a *Research Center of Neurology, Moscow, Russia*

Protein misfolding and accumulation of protein aggregates is a distinctive feature of most neurodegenerative diseases. They lead to disruption of cellular homeostasis, loss of synaptic connections, and therefore cellular apoptosis. It has been demonstrated that some innate immune responses play an important role in the emergence and progression of neurodegenerative diseases. Inflammasomes are components of innate immunity that play a major role in the maintenance of chronic inflammation. Inflammasomes function as intracellular sensors, detecting both exogenous and endogenous stimuli. They also take part in caspase-1 activation and synthesis of pro-inflammatory cytokines. In the central nervous system (CNS), inflammasomes are predominantly expressed by microglia, the key cells of innate immunity responsible for activation and maintenance of inflammation. In addition to microglia, inflammasomes can be expressed and activated by astrocytes and neurons, as well as infiltrating myeloid cells. Understanding the mechanisms of activation and functioning of inflammasomes is crucial for the development of novel drugs agents which are targeted at modulation of the immune response associated with their excessive activation. This review provides up-to-date information on the inflammasome structure and mechanisms of action, the role of protein misfolding, aggregation and their influence on inflammasome activation, as well as potential therapeutic targets in neurodegenerative diseases.

Keywords: inflammasomes, neurodegenerative diseases, amyotrophic lateral sclerosis, motor neuron disease, Alzheimer's disease, Parkinson's disease

УДК 577.25

РОЛЬ ПОЛИАМИНОВ В МЕХАНИЗМАХ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ© 2022 г. М. Г. Маклецова¹ *, Г. Т. Рихирева², Е. Ю. Кириченко¹,
И. Ю. Тринитатский³, М. Ю. Вакуленко¹, А. М. Ермаков¹¹ Донской государственный технический университет, Ростов-на-Дону, Россия² Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, Россия³ ГБОУ РО «Ростовская областная клиническая больница», Ростов-на-Дону, Россия

Поступила в редакцию 09.12.2021 г.

После доработки 25.04.2022 г.

Принята к публикации 28.04.2022 г.

По мере старения населения возрастные когнитивные нарушения становятся все более актуальной проблемой. В настоящее время активно обсуждается роль полиаминов (путресцина, спермидина и спермина) в патогенезе когнитивных нарушений различного генеза. При этом показано, что с возрастом содержание полиаминов в мозге снижается. Экзогенное введение полиаминов позволяет избежать когнитивные нарушения и/или повлиять на патогенетические процессы, связанные с прогрессированием различных патологий. Известны три способа поступления полиаминов в организм человека: из продуктов питания, синтеза бактериями кишечника и собственного биосинтеза в организме. В настоящее время одним из наиболее перспективных подходов к профилактике когнитивных нарушений является использование продуктов питания с высоким содержанием полиаминов, а также употребление различных пробиотиков, влияющих на бактерии кишечника, которые синтезируют полиамины. С 2018 года в ряде европейских стран были запущены проекты, направленные на оценку влияния диеты с высоким содержанием полиаминов на когнитивные процессы. В обзоре на основе анализа современной научной литературы и собственных данных авторов представлен материал о влиянии полиаминов на когнитивные процессы, роли полиаминов в регуляции нейромедиаторных процессов, а также обсуждается роль полиаминов в когнитивных нарушениях при неврологических и психических заболеваниях.

Ключевые слова: когнитивные нарушения, полиамины, спермин, спермидин, путресцин

DOI: 10.31857/S1027813322030050

Цель этого мини-обзора – обобщить информацию о некоторых аспектах обмена полиаминов при неврологических и психических заболеваниях и оценить возможности применения полиаминов для коррекции нарушений когнитивных функций.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОЛИАМИНОВ

Полиамины представляют собой большую группу органических поликатионов.

Поскольку первичные и вторичные аминогруппы полиаминов связаны с H^+ , при физиологических значениях pH полиамины взаимодействуют электростатически с отрицательно заряженными молекулами, такими как ДНК, РНК, белки и фосфолипиды [1]. В живых организмах полиамины представлены как в свободных (протонированных), так и в связанных формах. Взаимодействие полиаминов с нуклеиновыми кисло-

тами и кислыми макромолекулами более стабильно, чем с неорганическими катионами (Mg^{2+} и Ca^{2+}), что определяется наличием в молекулах полиаминов двух или нескольких положительно заряженных групп [2].

Полиамины принимают участие в различных важных биохимических процессах, таких как синтез, функционирование и поддержание стабильности нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) и белков [2], играют ключевую роль в клеточной передаче сигналов, связывании ДНК, транскрипции, сплайсинге РНК, функционировании цитоскелетов, в трансляции эукариот с помощью фактора инициации трансляции 5A (eIF5A) [3–7].

Такие эндогенные полиамины как путресцин, спермин и спермидин, представляют собой органические поликатионы, которые синтезируются из L-орнитина при декарбоксилировании (рис. 1).

К большой группе полиаминов относят ацетильные производные спермидина и спермина, а также кадаверин и агматин, образование которых

* Адресат для корреспонденции: 344003 Россия, Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, д. 1, e-mail: mgm52@bk.ru.

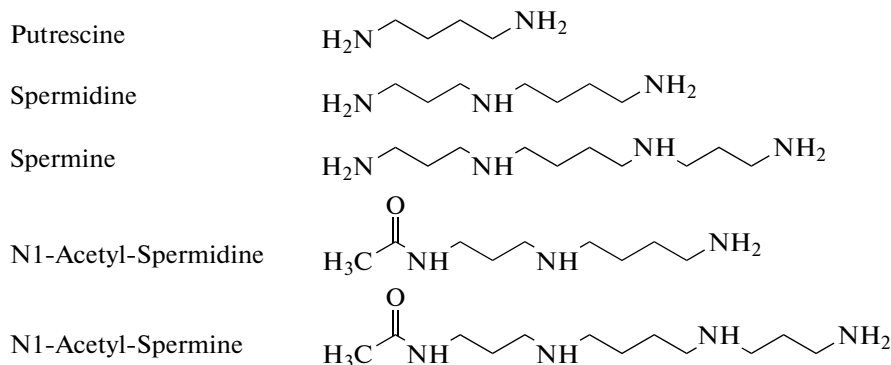


Рис. 1. Структура полиаминов и некоторых их ацетильных производных.

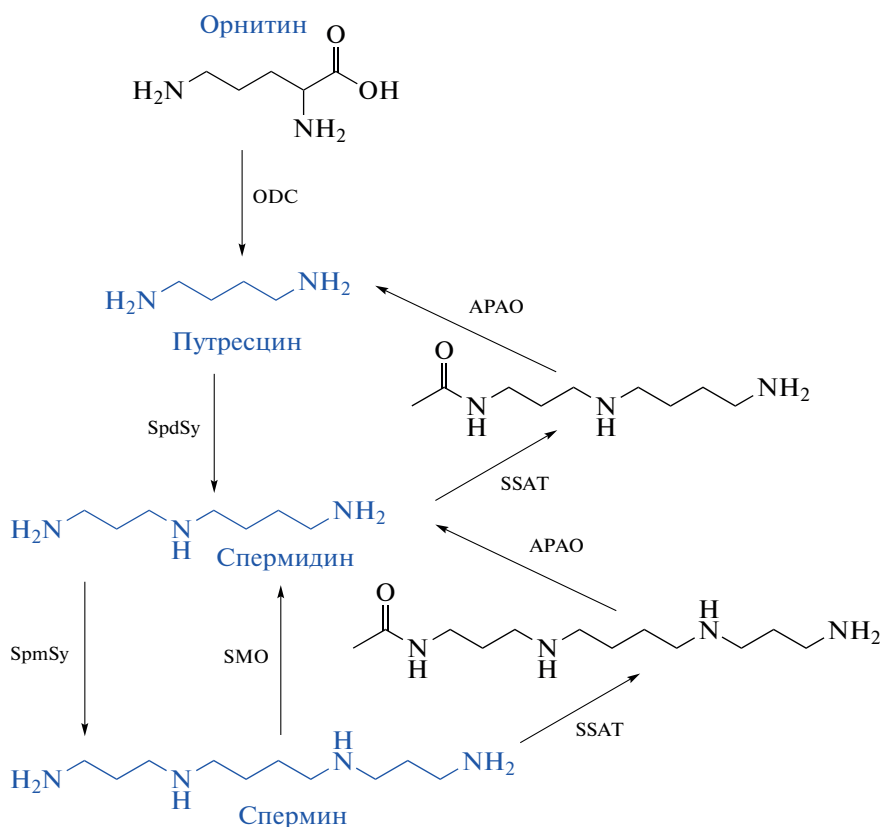


Рис. 2. Схема синтеза и распада полиаминов. (цитируется по [14]). Список сокращений: ODC – орнитиндекарбоксилаза; SpdSy – спермидинсинтаза; SpmSy – сперминсинтаза; SSAT – спермидин/сперминN1-ацетилтрансфераза; APAO – ацетилполиаминоксидаза; SMO – сперминоксидаза.

связано с декарбоксилированием лизина и аргинина. В данной статье обсуждается обмен и роль полиаминов спермидина и спермина, образование которых происходит с участием фермента орнитиндекарбоксилазы (ODC) (рис. 2), и для которых показана их способность увеличивать продолжительность жизни [8–14].

СПЕРМИДИН И СПЕРМИН УВЕЛИЧИВАЮТ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОСТЬ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЖИВОТНЫХ

Для полиаминов, особенно спермидина, увеличение продолжительности жизнеспособности организмов показано на целом ряде организмов и

клеточных систем, включая дрожжи (*S. cerevisiae*), дрожофилы, нематоды, иммунные клетки человека и мышей [9–14]. Установлено, что механизм увеличения продолжительности жизни спермидином связан с прямым ингибированием активности гистонацетиленотрансферазы (НАТ) и индукцией аутофагии [11]. Эффекты спермидина на активность НАТ приводят к глобальному для гистонов сценарию, в результате которого подавляется транскрипция *гипоацетилирования* многих генов [13]. Активация аутофагии спермидином включает ингибирование экспрессии *Atg* генов, регуляцию транскрипции eIF5A и TFE3, а также ингибирование ER300, который непосредственно способствует ацетилованию генов *Atg* и косвенно стимулирует деацетилирование тубулина [13]. Очевидно, что изучение метаболизма полиаминов является актуальной проблемой в связи с выше описанными эффектами.

ОБМЕН ПОЛИАМИНОВ В ОРГАНИЗМЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ В НОРМЕ

Синтез. Путресцин синтезируется из орнитина (рис. 2) [14]. Лимитирующим скорость биосинтеза полиаминов является фермент ODC [15]. Спермидинсинтаза (SpdSy) осуществляет перенос NH_2 (CH_2)₃-фрагмента от S-аденозилметионина к аминогруппе путресцина, что приводит к образованию спермидина. Спермин формируется путем переноса данного фрагмента к спермидину с участием фермента сперминсинтазы (SPMSy). Спермин и спермидин преобразуются обратно в путресцин в результате катаболизма с участием ферментов: полиаминоксидазы, сперминоксидазы (SMO), ацетилполиаминоксидазы (АРАО) и в свою очередь SMO осуществляет окислительный переход спермина в спермидин [16, 17].

Распад. Распад полиаминов может быть связан с преобразованием их в более низкомолекулярные полиамины в ходе двух последовательных ферментативных реакций. Первая: спермин или спермидин ацетируются ферментом спермидин/спермин N1-ацетилтрансферазой 1 (SSAT), который является ключевым регуляторным ферментом, определяющим распад полиаминов [18]. Вторая состоит в окислительном расщеплении между C3 и N4 в ацетилированных спермине и спермидине с образованием более низкомолекулярных полиаминов и 3-аминопропаналя. Важно отметить, что как синтез полиаминов, так их распад осуществляются с переносом трехатомного (CH_2)₃-фрагмента.

К распаду полиаминов также приводит их окисление.

Продуктами окисления полиаминов являются более низкомолекулярные полиамины, H_2O_2 , 3-аминопропаналь (3-АП) и 3-ацетиламинопропаналь [2, 18]. Эти альдегиды неустойчивы и самопро-

извольно переходят в акролеин после дезаминирования. Акролеин, ненасыщенный альдегид, легко вступает в реакцию с остатками лизина белков с образованием белок-конъюгированного акролеина (protein-conjugated acrolein, PCAcrolein) [17]. Акролеин, высокотоксичный ненасыщенный альдегид, при взаимодействии с белками, липидами, нуклеиновыми кислотами оказывает системное повреждающее действие, что приводит к гибели клеток. Показано, что при экспериментальном фото-индуцированном инсульте содержание акролеина в зоне некроза увеличивается в 28 раз, что связано с активацией распада полиаминов. Акролеин является значительно более токсичным соединением, чем H_2O_2 [17].

Регуляция обмена полиаминов. Активности ферментов биосинтеза и распада полиаминов ODC и SSAT регулируются за счет изменений концентраций полиаминов, а также различными соединениями: факторами роста, гормонами и т.д. [1, 2, 15–17]. При высоких концентрациях спермидина и спермина в клетках активности ферментов синтеза полиаминов (ODC и SAMDC) подавляются, в то время как активность ферментов распада (SSAT) увеличивается. И, наоборот, когда клеточное содержание полиаминов снижается, ODC и SAMDC позитивно регулируются и SSAT подавляется. Регуляция синтеза и распада полиаминов происходит на уровне транскрипции и трансляции биосинтеза данных ферментов [16]. При увеличении содержания полиаминов внутри клетки активность ODC подавляется путем индукции белка – антизима (antizyme, AZI), образующего комплекс с ODC-мономером, приводящей к инактивации его ферментативной активности (рис. 3) [19].

Деградация этого комплекса происходит в 26S протеасомах. Кроме того, белки – антизимы способны ингибировать поглощение полиаминов или стимулировать их секрецию. Показано существование 3-х форм антизимов AZI: AZI 1, AZI 2 и AZI 3 [21]. Более сложная регуляция активности ODC представлена белками – ингибиторами антизимов (antizyme inhibitor, AZIN), которые способны взаимодействовать с AZI с более высоким сродством, чем к ODC. В настоящее время идентифицировано две их формы: AZIN 1 и AZIN 2 [21].

Транспорт полиаминов в клетку осуществляется транспортерами OCT (organic cation transporter) [21].

Таким образом, в норме гомеостаз полиаминов в организме поддерживается сложными механизмами обратной связи на уровне их биосинтеза, распада, поглощения и выведения их из клетки. Вместе с тем, не менее важным вопросом в регуляции обмена полиаминов является оценка поступления их из кишечника. Известны три способа поступления полиаминов в организм человека: из про-

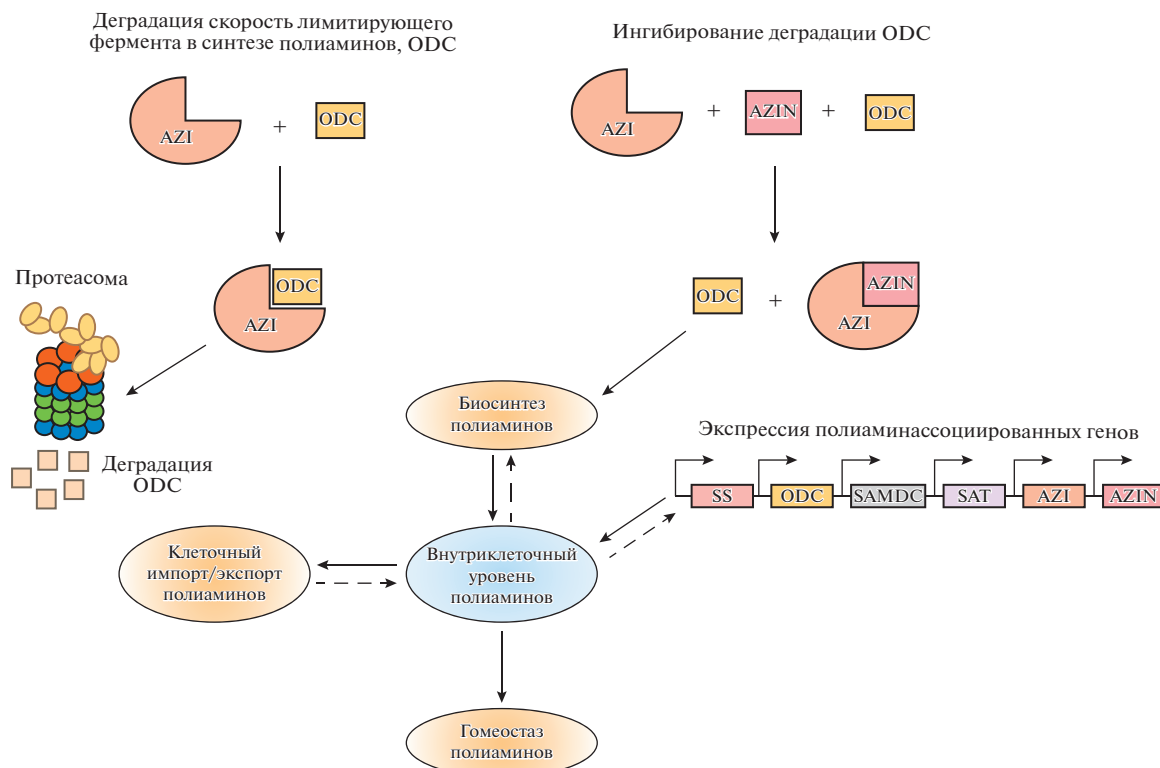


Рис. 3. Схема регуляции биосинтеза полиаминов (цитируется по [19]). Сокращения: ODC – орнитиндекарбоксилаза; AZI – antizyme, AZIN – antizyme inhibitor.

дуктов питания, синтеза бактериями кишечника и собственного биосинтеза в организме. Изучению содержания полиаминов в продуктах питания и оценке влияния пробиотиков на содержание полиаминов в организме человека посвящено много работ [22–24].

НАРУШЕНИЯ ГОМЕОСТАЗА ПОЛИАМИНОВ

Нарушения в метаболизме полиаминов могут приводить к тяжелым неврологическим заболеваниям, например, мутации в сперминсинтазе и последующие изменения уровня спермина и спермидина являются причиной синдрома Снайдера-Робинсона [25]. Аналогичным образом мутация в гене ODC1 приводит к тяжелым последствиям, таким как макросомия, макроцефалия, задержка развития, алопеция, спастичность, гипотония, кожные сосудистые мальформации, нарушение зрительного восприятия и нейросенсорная тугоухость [26]. Исследования Jain et al. 2018, показали, что подавление распада полиаминов связано с спермин-опосредованным повреждением эпителия дыхательных путей и провоцирует развитие астмы [27]. В модельных опытах на мышах с инактивацией SMOX и с комбинированной инактивацией SMOX и SSAT1 обнаружено повышение уровня

спермина и снижение уровня спермидина в головном мозге и в мозжечке *Smoх-KO* и *Smoх/Sat1-dKO* по сравнению с интактными животными [28]. В опытах на мышах *Smoх/Sat1-dKO* показано, что длительный дефицит катаболизма полиаминов вызывает активацию TGM2 90 и усиленную экспрессию α -синуклеина, полиаминирование и агрегацию белков с последующей активацией цепи событий, которые приводят к повреждению мозжечка и атаксии у мышей *Smoх/Sat1-dKO* [28].

ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ПОЛИАМИНОВ В НЕРВНОЙ ТКАНИ

Путресцин, спермин и спермидин представлены во всех структурах мозга [29, 30]. Ферментативная система ODC локализована в ядрах нейронов, в дендритах, аксонах и нервных терминалах. В нейронах обнаружена высокая активность спермин- и спермидинсинтаз [31–33].

В головном мозге присутствуют все ферменты распада полиаминов – SSAT, диаминооксидаза и полиаминоксидаза. В процессе распада полиаминов также участвует MAO [30]. Важно отметить, что модификация молекулярной структуры MAO, вызванная окислительным стрессом, приводит к изменению субстратной специфичности и активации MAO по отношению к полиаминам [30]. Су-

ществует еще несколько метаболических путей превращения полиаминов в ЦНС. Показано вовлечение путресцина в биосинтез ГАМК и дальнейшее превращение в гистидинсодержащий дипептид – гомокарнозин [34]. Содержание полиаминов в глии значительно выше, чем в нейронах [31, 33]. Тот факт, что полиамины синтезируются в нейронах, а аккумулируются в глии, позволил Скачкову с соав. [31] разработать гипотезу о роли полиаминов как глиотрансмиттеров, регулирующих функцию нейронов. В транспорте полиаминов в клетки мозга участвуют эндотелий и капилляры [31].

Процесс поглощения/высвобождения полиаминов происходит с участием транспортера органических катионов 1 (organic cation transporter, OCT 1), через глиальные щелевые соединения и гемиканалы коннексина-43 (Cx43 NCs) и через полиамин-проницаемые рецепторы и каналы [33].

Полиамины и щелевые контакты головного мозга. В ЦНС помимо участия в осуществлении базовых регуляторных функций, таких как регуляция биосинтеза белков, РНК и ДНК и др., полиамины выполняют ряд специфических функций: модулируют разные стороны обмена, синтеза и распада различных нейромедиаторов, а также их взаимодействие с рецепторами [30, 35]. Благодаря способности полиаминов взаимодействовать с мембранами они могут модулировать активности мембраносвязанных ферментов, в частности Na,K-АТФазы [36].

Стоит отметить связь полиаминов и межклеточных щелевых контактов головного мозга в норме и при развитии нейропатологий. Щелевые контакты (ЩК) – это система плотно упакованных каналов, пронизывающих билипидные слои мембран двух контактирующих клеток. Каждый такой канал состоит из двух состыкованных полуканалов, называемых коннексаонами, при этом субъединицей каждого коннексаона является белок коннексин. Во взрослом нормальном мозге ЩК способствуют образованию глиальных синцитиев – трехмерных глиальных каркасов, выполняющих ряд важнейших функций, таких как контроль концентраций внеклеточных ионов и нейротрансмиттеров, а также осуществление метаболических процессов [37]. Для поддержания этих функций в синцитии необходимым условием является открытие ЩК, что связано с наличием полиаминов [38]. При этом во взрослом мозге накопление полиаминов (спермина, спермидина, путресцина, агматина) является отличительной особенностью именно астроцитов, но не нейронов [39–41, 31]. Уникальная способность коннексина 43 (Cx43) поддерживать в открытом состоянии ЩК в синцитии была показана при сравнении Cx43 и Cx40 и демонстрации явления блокады поли-

аминами аминокислотной последовательности (сайта связывания) в N-конце Cx40 [17–21]. Такие специфические сайты связывания для полиаминов спермина не были обнаружены в Cx43 [42]. Более того, в дальнейших исследованиях было отмечено, что Cx43 чувствителен к полиаминам, которые открывают каналы ЩК, а также, что наиболее важно для физиологии клеток, полиамины устраняют блокаду этих каналов катионами водорода [44] и кальция [45]. Устранение катионного блока полиаминами является критически важным фактором для функционирования ЩК в глии, поскольку именно подкисление цитоплазмы и последующее высвобождение кальция (так называемые кальциевые волны в астроцитах) является отличительным свойством астроцитарного синцития, но не нейронных ансамблей. Обеспечивая распространение калиевых и кальциевых волн в глиальном синцитии, ЩК и полуканалы напрямую способны контролировать активность как отдельных нейронов, так и нейронных сетей. В то же время деполяризация такого синцития при повышении концентрации ионов калия при эпилепсии, нейротравме или ишемии [46] ведет к потере астроцитами способности устранять избыток калия из межклеточного пространства, что приводит к инактивации нейрональной активности и нейропатологиям.

РОЛЬ ПОЛИАМИНОВ В ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ МОЗГА

Регуляция стробирования. Полиамины классически рассматриваются как регуляторы стробирования ионных каналов. Спермин регулирует ионный транспорт, участвуя в процессе ректификации калиевых каналов. Впервые А. Лопатиным и соавт. был раскрыт механизм так называемого аномального выпрямления – свойства спермина осуществлять ректификацию калиевых ионных каналов семейства KirX.X. и носит потенциал-зависимый характер [47–49].

В настоящее время установлено, что полиамины обеспечивают ректификацию калиевых каналов, каналов AMPA- и nACh-рецепторов [35, 50]. Механизм ректификации каналов полиаминами прост: деполяризация мембраны вызывает спонтанное втягивание цитозольных полиаминов во внутрь поры канала, тем самым полиамины блокируют поток положительно заряженных ионов во внутрь клетки через поры рецепторов [50]. Таким образом, внутриклеточные полиамины обеспечивают контроль перевозбуждения данных рецепторов. Указанное свойство цитоплазматических полиаминов осуществляется благодаря тому, что у них низкая молекулярная масса и при физиологических значениях pH они имеют положительный заряд.

Регуляция полиаминами синтеза nACh-рецепторов. Для спермина показана способность не только стробировать nACh-рецепторы, но и модулировать активность фермента обмена ACh — ацетилхолинстеразы. Другой уровень регуляции полиаминами обмена ацетилхолина был недавно обнаружен Дхара и др. [51]. Продемонстрировано, что полиамины контролируют сборку нейрональных никотиновых $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 7$ ацетилхолиновых рецепторов [41]. Эта способность уникальна, поскольку полиамины не модулируют сборку каких-либо других ионных каналов. Примечательно, что снижение уровня полиамина повышает уровни $\alpha 4\beta 2$ и $\alpha 7$ ACh [51] в мозге. Авторы показали четкую корреляцию между вызванными ацетилхолином потенциалами действия и активностью SSAT. $\alpha 4\beta 2$ - и $\alpha 7$ ACh-рецепторы являются наиболее распространенными рецепторами ацетилхолина.

Регуляция полиаминами NMDA-рецепторов. В многочисленных исследованиях показаны множественные эффекты внеклеточных полиаминов на чувствительные к глутамату рецепторы: NMDA, AMPA и каинат [35, 50, 52, 53]. Полиамины оказывают двухфазный эффект на глутаматные рецепторы: они либо блокируют каналы AMPA- и NMDA-рецепторов в высоких дозах, либо активируют каинат- и NMDA-рецепторы при низких концентрациях [22].

В цикле работ Вильямса и соавт. (1984–1989) показано, что комплекс рецепторов NMDA обладает сайтом распознавания полиаминов, также, как и у коннексинов [54–58, 37]. Рецепторы NMDA являются преобладающим молекулярным устройством для контроля синаптической пластичности и функции памяти на клеточном уровне, полиамины, по-видимому, эффективно модулируют их. Эффекты полиаминов на NMDA-рецепторы впервые были обнаружены при анализе их связывания с спермином и спермидином, но не диаминпутресцина. Показана способность спермина и спермидина специфически взаимодействовать с полиамин-связывающим аллостерическим сайтом глутаматных рецепторов [35].

Выявлено четыре типа эффектов спермина на NMDA-рецепторы в мозге, которые различались в зависимости от мембранного потенциала, pH и концентрации агониста и ко-агониста. Первый тип — стимуляция потока ионов Ca в присутствии “замещающих” концентраций глицина, так называемая глицин-зависимая стимуляция [56, 59]. Соответственно, спермин увеличивает сродство NMDA-рецепторов к глицину, независимо от того, содержат ли эти рецепторы субъединицы GluN2A или GluN2B. Более того, этот эффект спермина не был чувствителен к изменениям внеклеточного pH. Вторым типом реагирования NMDA-рецепторов на спермин является стимуляция потока катионов, которую наблюдают в

присутствии насыщенных концентраций глутамата и глицина, так называемая *независимая от глицина стимуляция* [55, 60]. Мони и др. идентифицировали сайт связывания, ответственный за индуцированную спермином независимую от глицина стимуляцию GluN2B-содержащей субъединицы в NMDA-рецепторах [61]. Показано, что полиамины *активируют NMDA-рецепторы, экранируя отрицательные заряды в аминокислотной последовательности в белках субъединиц GluN1 и GluN2B* [61]. Третий тип реагирования — спермин — *может снизить чувствительность к глутамату глутаматных рецепторов*, что связано со снижением сродства к рецептору. Этот эффект наблюдается только на рецепторах, содержащих субъединицы GluN1 и GluN2B, и, вероятно, включает сайт связывания спермина, ответственный за независимую от глицина стимуляцию [61]. Наконец, 4 тип реагирования — спермин может также связываться с порами ионного канала и индуцировать зависящую от напряжения блокировку канала в месте, связанном с *внеклеточным сайтом связывания для Mg²⁺* [62]. Причем эффективность спермина на два порядка выше Mg²⁺ [31]. Синтезированы селективные ингибиторы связывания полиаминов с субъединицами NR2B NMDA-рецепторов — аркаин, ифенпродил и траксопродил, введение которых экспериментальным животным вызывает нарушение процесса запоминания и воспроизведения условного рефлекса [64]. При введении спермина или спермидина в область гиппокампа наблюдается значительное увеличение способности к обучению. Таким образом, была установлена прямая связь между полиаминным сайтом связывания с субъединицами NR2B NMDA-рецепторов с нарушениями процессов памяти [35, 50, 65].

На модели фокальной ишемии мозга у крыс было обнаружено, что при нарушениях памяти и обучаемости, вызванных ишемией, глицин облегчал формирование, но не влиял на сохранность приобретенного навыка. В то время как спермин способствовал выработке условного рефлекса, который воспроизводился в течение всего периода наблюдения [30].

Очевидно, полиамины являются позитивными модуляторами NMDA-рецепторов и способны компенсировать дисфункцию глутамат- и холингергической передачи, тем самым устраняя нарушения памяти и обучаемости.

Нейротоксичность полиаминов. Ранее было показано, что избыточные уровни полиамина нейротоксичны [50] и что прямая внутримозговая инфузия спермина может спровоцировать нарушение врожденного иммунного ответа. Добавление полиаминов может оказывать токсическое воздействие на культуру нейронов. При инкубации чистой нейрональной культуры с 50 мкМ

спермина наблюдается гибель клеток, в то время как в целостной структуре срезов мозга, состоящей из нейронов и глии (астроцитов), данная концентрация спермина не вызывала их гибели [31].

Нейротоксичность полиаминов может быть связана с развитием окислительного стресса, который вызывается индукцией, во-первых, H_2O_2 и, во-вторых, ненасыщенных альдегидов, таких как 3-АП и акролеин [16, 17, 30]. Добавление спермина и спермидина в культуру клеток, содержащую сыворотку крови, вызывает ингибирование пролиферации любых типов клеток за счет образования продуктов окисления полиаминов – H_2O_2 и акролеина [16]. В нейрональной клеточной культуре полное ингибирование роста клеток достигается при инкубации с 10 мкМ акролеина, 100 мкМ H_2O_2 и 20 мкМ ОН [16]. При этом акролеин является более токсичным агентом для ткани мозга, чем АФК. Введение в нейрональную культуру, содержащую токсические дозы спермина, альдегиддегидрогеназы – фермента, устраняющего акролеин, предотвращало гибель клеток [23]. На модели ишемии, вызванной глюкозоокислородной депривацией, на культуре нейробластомы M. Nakamura с соотв. установили, что именно Ca^{2+} является фактором, индуцирующим токсичность полиаминов, при этом в нейроне происходит снижение содержания полиаминов и увеличение образования продуктов их распада (PCAcrolein) [21]. Одним из основных путей для входа Ca^{2+} в нейроны являются каналы AMPA и NMDA рецепторов. В опытах на животных показано, что введение N^1, N^4, N^8 -трибензилспермидина – блокатора канала NMDA-рецепторов приводит к снижению содержания Ca^{2+} и PCAcrolein в нейронах, что ассоциируется с уменьшением размера очага инфаркта мозга [21]. Установлено, что полиамины глии способны защищать нейроны от гибели, регулируя данные рецепторные каналы нейронов [31].

Полиамины-нейропротекторы. Нейропротекторный эффект полиаминов показан в опытах на животных при моделировании нейродегенеративных заболеваний. К таким заболеваниям относят болезнь Гентингтона, обусловленную мутациями – увеличением количества тринуклеотидных повторов CAG, которые кодируют аминокислоту глутамин. Экспансия CAG-повторов приводит к увеличению длины полиглутаминового участка в белке гентингтине (Htt). Клиническая картина болезни Гентингтона характеризуется двигательными, психическими и когнитивными расстройствами, связанными с глутаматными рецепторами [68]. Дозозависимый нейропротекторный эффект спермидина был обнаружен при моделировании болезни Гентингтона при интрастриатальном введении хинолиновой кислоты [69]. Авторы об-

наружили, что низкая доза спермидина увеличивает активность NMDA-рецепторов в стриатуме, а высокая доза снижает рецепторную активность NMDA-рецепторов в этой модели [68].

Болезнь Паркинсона – возраст-зависимое нейродегенеративное заболевание, патологическими признаками которого являются двигательные и когнитивные нарушения, связанные с потерей дофаминергических нейронов в черной субстанции мозга, аномальным накоплением железа в этой структуре и наличием внутриклеточных агрегатов неправильно свернутых белков, состоящих в основном из альфа-синуклеиновых фибрилл и ряда других белков [70]. Показан нейропротекторный эффект спермидина при моделировании болезни Паркинсона введением роте-нона, который связан с антиоксидантными свойствами полиаминов [70].

Для нейродегенеративных заболеваний, несмотря на различие триггерных инициирующих событий, характерны общие механизмы, приводящие к гибели клеток мозга. В качестве таких механизмов рассматривают избыточное образование АФК, дефицит эндогенной антиоксидантной системы и эксайтотоксичность. Полиамины, являясь “ловушками” для свободных радикалов, способны существенно снизить уровень АФК [71, 72] и эксайтотоксичность [35, 50].

НАРУШЕНИЕ ОБМЕНА ПОЛИАМИНОВ ПРИ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Существует целый ряд экспериментальных доказательств участия полиаминов в патогенезе многих из известных неврологических заболеваний, при которых наблюдаются нарушения памяти и поведения. Когнитивные нарушения, возникновение которых связывают с нарушением обмена полиаминов, являются характерными для пациентов с болезнью Альцгеймера, болезнью Паркинсона, болезнью Гентингтона, при остром воспалительном процессе в нервной системе, при острых и хронических нарушениях мозгового кровообращения и черепно-мозговой травме [31, 32, 35, 50, 66]. Особенно важно изучение роли полиаминов в молекулярных механизмах патогенеза болезни Альцгеймера. Показано, что для болезни Альцгеймера характерно накопление тау-белка, образующего нейрофибрилярные клубки, и нейротоксического амилоидного бета-пептида, ответственного за образование сенильных бляшек [34]. Одновременно у пациентов с болезнью Альцгеймера наблюдается высокая активность ODC, увеличение ее генной экспрессии и увеличение содержания спермидина и спермина в головном мозге, что авторы связывают с ролью полиаминов в когнитивном дефиците и в синаптической потере [50]. Моделирование болезни Альцгеймера (введение амилоидного бета-пептида) в опытах на

животных показало, что введение ингибитора синтеза полиаминов DFMO (дифторметилорнитин) или блокирование сайта связывания спермина с NMDA-рецепторами аркаином восстанавливает нарушенную память у мышей.

Болезнь Паркинсона является еще одним нейродегенеративным заболеванием, при котором обнаружены нарушения в обмене полиаминов, связанные с генетическими мутациями [73, 74]. Дефицит АТР13А2 (PARK9) приводит к выраженным изменениям в экспорте полиаминов [74]. При болезни Паркинсона изменяется экспрессия фермента SSAT, что приводит к увеличению содержания ацетильных производных полиаминов и нарушению их обмена [73]. Механизмы участия полиаминов в снижении когнитивных функций у пациентов с болезнью Паркинсона связаны с модуляцией NMDA-рецепторов, а также с агрегацией α -синуклеина [75]. Нами было изучено содержание спермидина в эритроцитарной массе крови пациентов, страдающих болезнью Паркинсона, которое коррелировало с показателями MMSE. Так, в крови больных 1–2-ой стадиями заболевания (MMSE = 25–27 баллов) содержание спермидина значительно увеличивалось по сравнению с донорской кровью, а в крови больных на поздних стадиях (3–4-я) (MMSE = 12) с выраженными когнитивными нарушениями наблюдалось снижение содержания спермидина по сравнению с контролем [75].

ПОЛИАМИНЫ И ПСИХИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

В настоящее время получены доказательства участия полиаминов в патогенезе многих из известных психических заболеваний [76]. Показано изменение в экспрессии и активности ферментов распада полиаминов, в содержании индивидуальных полиаминов (путресцина, спермидина и спермина) при шизофрении, депрессии, тревожных синдромах и др. [77–79]. Особое место в нейрохимии психических заболеваний занимают работы, посвященные изучению роли полиаминов в патогенезе депрессивных состояний с последующим суицидальным исходом [79]. Так в образцах аутопсии 22 областей мозга лиц, погибших в результате суицида, обнаружены значительные различия по сравнению с контролем в экспрессии генов, ответственных за метаболизм полиаминов: ODC, AZI 1 и AZI 2, сперминоксидазы, сперминсинтетазы и семейства альдегиддегидрогеназ (ферментов, удаляющих продукты распада полиаминов – токсические альдегиды) [79]. Причем, как обнаружено в нескольких независимых исследованиях, особенно выражено снижение экспрессии фермента SSAT в аутопсии образцов коры головного мозга у людей, умерших при суициде [80]. Снижение экспрессии SSAT в мозге больных, по-

гибших при суициде, приводит к значительному увеличению содержания спермидина и путресцина в структурах мозга по сравнению с их содержанием в мозге психически здоровых лиц.

Таким образом, по-видимому, генетически детерминированное нарушение в обмене полиаминов является одним из патогенетических механизмов психических расстройств.

ПОЛИАМИНЫ И ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ

С возрастом содержание полиаминов в мозге снижается [81], что по мнению ряда авторов играет ведущую роль в возрастных изменениях когнитивных функций [81, 82]. Установлено, что введение спермина и/или спермидина оказывает существенное положительное влияние на когнитивные и поведенческие реакции у старых животных [83]. Важно отметить, что введение спермидина или спермина оказывает регулирующее влияние на белки аутофагии [84]. Спермидин и спермин поддерживают энергетический обмен нейронов [84–86]. Кроме того, результаты анализа таких показателей как Bcl-2, Вах, Каспаза-3, NLRP3, IL-18 и IL-1 β показали, что спермидин и спермин предотвращают апоптоз и воспаление [86]. В 2013 году V.K. Gupta et al. в опытах на стареющих мухах обнаружили, что пищевые добавки со спермидином ослабляют возрастные нарушения памяти с помощью механизмов аутофагии [86]. В 2016 году в работах T. Eisenberg et al. сообщалось, что пероральное введение спермидина мышам снижало гипертрофию миокарда и системное кровяное давление, усиливало сердечную аутофагию и улучшало механоэластические свойства кардиомиоцитов [86].

Учитывая злободневность проблемы следует остановиться на данных о возможности использования спермидина в качестве антивозрастного соединения в противостоянии инфекции COVID-19 [85]. В доступной литературе отражена растущая озабоченность о влиянии коронавирусной инфекции не только на физическое но и на психическое здоровье человека. Наиболее важными признаками психических расстройств, наблюдаемых при COVID-19, являются симптомы депрессии и тревожности, а также когнитивные нарушения. Обращает на себя внимание пересечение (crosstalk) признаков старения и систем, которые поражаются при коронавирусной инфекции, а также более высокий уровень смертности у пожилых пациентов. Один из признаков возрастных изменений это постоянное укорочение теломер, которые являются защитными структурами на концах хромосом. Истощение теломер способствует снижению тканей к регенерации, потере тканевого гомеостаза, к заболеваниям. При определении длины теломер в лимфоцитах перифери-

ческой крови пациентов с COVID-19 было обнаружено, что более короткие теломеры связаны с большей тяжестью заболевания [85]. Обнаруженное свойство спермидина поддерживать теломеры, удлинять их при добавке полиамина в рацион, может, по-видимому, определить как антивозрастные эффекты спермидина, так и его вклад в противовирусное действие [12]. Некоторые авторы считают, что нарушение аутофагии, как характерной черты старения, может привести к тяжести COVID-19 [85]. Спермидин является индуктором аутофагии. Тем не менее, механизмы взаимодействия аутофагии и COVID-19 пока остаются не выясненными.

В целом изучение противовирусных эффектов антивозрастных соединений, в частности полиаминов, имеет большое значение для решения вопросов терапевтической стратегии.

ВЛИЯНИЕ НА КОГНИТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ ВВЕДЕНИЯ ПОЛИАМИНОВ В ДИЕТУ ПОЖИЛЫМ ПАЦИЕНТАМ. КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ

Обоснованием для клинических испытаний явился обнаруженный эффект спермидина на аутофагию. Спермидин обладает способностью запускать важный процесс растворения бета-амилоидных бляшек путем аутофагии [50, 86]. Установлена четкая корреляционная зависимость между уровнем спермидина в крови и когнитивными показателями у пациентов с болезнью Альцгеймера с деменцией [87]. Диетическое потребление спермидина коррелирует с когнитивными показателями у людей [88]. Были проведены исследования на мышах, которые подтвердили безопасность и хорошую переносимость полиаминов, полученных из зародышей пшеницы [86]. Эти данные позволили использовать спермидин в клинических испытаниях. Показано, что количество полиаминов — 13,5 мкг/кг массы тела в сутки для спермидина или 3,1 мкг/кг массы тела в сутки для спермина является дозой “отсутствия побочного эффекта”.

В 2018 году M. Wirth et al. опубликовали результаты одного из первых пилотных клинических испытаний, посвященных оценке способности полиаминов улучшать когнитивные функции у пожилых пациентов, в котором было показано, что прием с пищей 1200 мг спермидина в день в течение 3 месяцев улучшает когнитивных функций по сравнению с контрольной группой [88]. T. Rekar et al. в 2020 году сообщили, что диета, обогащенная спермидином, может предотвратить потерю памяти при старении. Была установлена четкая корреляция между концентрацией спермидина и улучшением когнитивных показателей у пациентов с легкой и умеренной деменцией. Одновременное введение в диету 200 мкг путресцина, 900 мкг спермидина и 500 мкг спермина

(всего 1600 мкг) в день в течение 12 месяцев пожилым людям оказало наиболее эффективное позитивное влияние на когнитивные процессы [89, 90].

В настоящее время в ряде работ обсуждаются результаты обследования пациентов с болезнью Альцгеймера, получавших диету с полиаминами [91, 92].

ВЛИЯНИЕ СТРЕССА НА ОБМЕН ПОЛИАМИНОВ В МОЗГЕ

Полиамины активно вовлечены в молекулярные механизмы реализации неспецифической стресс-реакции — так называемый полиаминный стресс-ответ (ПСО) [93, 94]. При стрессорном воздействии на организм в целом (ожог, травма и пр.) в мозге активируется ОДС с последующим значительным увеличением содержания полиаминов в первые сутки, что запускает активацию генов “раннего” ответа — *c-fos*, *c-jus*, *c-myc* [95, 96]. Нами было обнаружено, что в мозге животных, перенесших ожоговый стресс, содержание спермина и спермидина снижалось на 5-7 сутки после ожогового стресса по сравнению с контролем. Введение адаптогена (ДСИП) после стресса оказывало модулирующее воздействие на метаболизм полиаминов в мозге на 5–7 сутки после ожога: содержание спермидина увеличивалось на 5 сутки, интенсивность включения радиоактивной метки из [C^{14}]-орнитина в полиамины увеличивалась для спермина в 3 раза ($p \leq 0.01$) на 7 сутки после стресса по сравнению с контролем (рис. 4).

При данном стрессорном воздействии наблюдались нарушения памяти и обучаемости. Введение адаптогена (ДСИП) вызванное им последующее увеличение биосинтеза полиаминов облегчало формирование новых навыков, а также положительно влияло на сохранность приобретенного навыка до стресса [95].

ПОЛИАМИННЫЙ СТРЕСС ОТВЕТ И ТАУ-ПАТОЛОГИИ

В нервной ткани обнаружены метаболические особенности ПСО, которые зависят от характера стрессорного воздействия [79]. При психоэмоциональном стрессе, а также ишемии/гипоксии мозга происходит более интенсивная активация ферментов распада полиаминов, которая превышает скорость их синтеза. При этом наблюдается резкое увеличение активности ОДС и содержания путресцина при одновременном снижении содержания спермидина и спермина. В модельных опытах на животных было обнаружено, что ответная реакция со стороны системы полиаминов на стрессорные воздействия различается в зависимости от длительности стрессорного воздействия и определяет характер метаболизма полиаминов в мозге. Данные, полученные Sandusky-Beltran et al. в

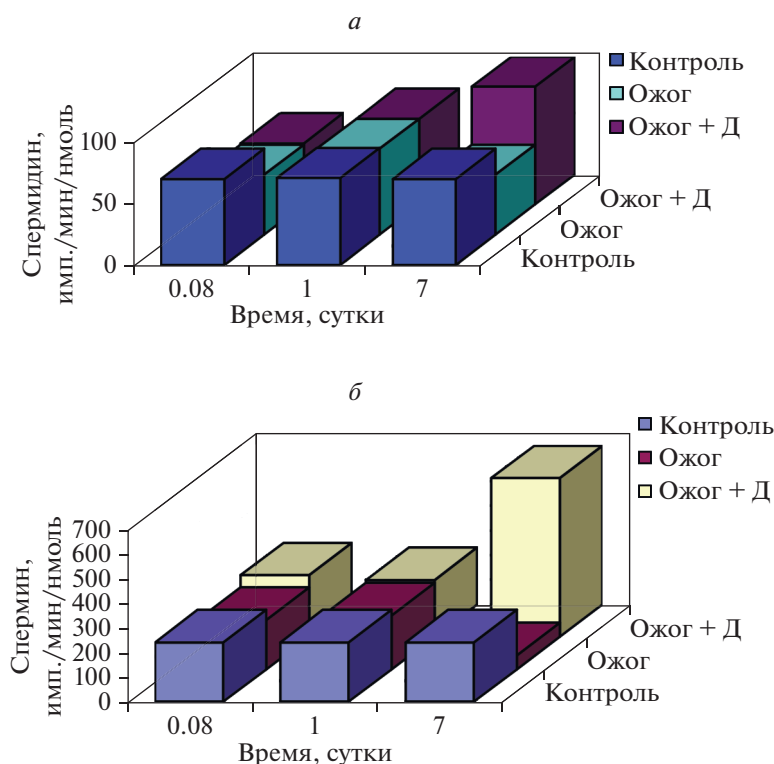


Рис. 4. Влияние введения ДСИП на интенсивность включения радиоактивной метки из $[C^{14}]$ -орнитина в спермидин (а) и спермин (б) в мозге крыс после ожога.

2019 году, свидетельствуют о том, что повышение уровня полиаминов, вызванное кратковременным стрессорным воздействием, “полезно” для нервной системы [97]. При этом спермидин и спермин способны уменьшать содержание тау-белка, ассоциированного с микротрубочками, за счет активации аутофагии. Однако, длительное хроническое стрессорное воздействие приводит к дезадаптивной дисрегуляции обмена полиаминов и оказывает негативное воздействие.

Sandusky-Beltran et al. в 2021 году сообщили об уникальной связи между метаболизмом полиаминов, поведенческими нарушениями и судьбой тау-белка [98]. Как известно, для тау-патологий характерно наличие тех или иных когнитивных и аффективных поведенческих нарушений [99]. Обнаружено, что при болезни Альцгеймера происходит дисрегуляция транскриптов генов, связанных с метаболизмом полиаминов в мозге, при этом в значительной степени повышается уровень антизимного ингибитора ODC AZIN 2, что значительно увеличивает содержание ацетильных производных полиаминов, усиливает накопление тау-белка и способствует когнитивным и аффективным нарушениям поведения [98].

Поддержание гомеостаза в обмене полиаминов является потенциальным способом лечения болезни Альцгеймера и тау-патологий [100].

Таким образом, ПСО может вызывать как положительные, так и отрицательные последствия в ЦНС в зависимости от длительности и характера стрессорного воздействия. Введение адаптогенов оказывало модулирующее воздействие на содержание полиаминов, которое позволяло положительно сказываться на процессах запоминания и обучения. Важно отметить, что в настоящее время ПСО рассматривается как провокационный фактор в механизмах запуска неврологических и психических заболеваний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время нарушения в метаболизме полиаминов и в их внутриклеточном распределении рассматриваются как патогенетические механизмы развития многих заболеваний, которые сопровождаются когнитивными расстройствами. Спермидин и спермин способны значительно улучшить процесс обучения, запоминания и повысить работоспособность благодаря модулированию нейромедиаторных процессов (nAch, полиаминным сайтом NMDA-рецепторов) и активации аутофагии в ЦНС. Тот факт, что функциональная активность данных рецепторов связана с контролем синаптической передачи сигналов и механизмами пластичности, а также с формированием памяти

и механизмами запоминания, позволяет рассматривать полиамины в качестве положительных модуляторов когнитивных процессов. В связи с этим полиамины представляют перспективное направление для разработки терапии когнитивных нарушений. Успешное практическое применение полиаминотерапии напрямую связано с развитием наших представлений о функциональной значимости полиаминов в патогенезе когнитивных нарушений, а также тщательным анализом возможных противопоказаний к ее применению.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 22-25-00795, <https://rscf.ru/project/22-25-00795/>.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pegg A.E. // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. P. 14904–14912. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.731661>
2. Park M.H., Igarashi K. // *Biomol. Ther. (Seoul)*. 2013. V. 21. № 1. P. 1–9.
3. Ramani D., De Bandt J.P., Cynober L. // *Clin. Nutr.* 2014. V. 3. № 1. P. 14–22.
4. Landau G., Ran A., Bercovich Z., Feldmesser E., Horn-Saban S., Korkotian E., Jacob-Hirsh J., Rechavi G., Ron D., Kahana C. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 35825–35837. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112>
5. Handa A.K., Fatima T., Mattoo A. // *Front. Chem.* 2018. V. 6. P. 10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00010>
6. Zwihaft Z., Aviram R., Shalev M., Rouso-Noori L., Kraut-Cohen J., Golik M., Brandis A., Reinke H., Aharoni A., Kahana C., Asher G. // *Cell Metab.* 2015. V. 22. № 5. P. 874–885. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.09.011>
7. Thomas E. Dever T.E., Ivanov I.P. // *J. Biol. Chem.* 2018. V. 293. № 48. P. 18719–18729.
8. Minois N., Carmona-Gutierrez D., Madeo F. // *Aging (Albany NY)*. 2011. V. 3. P. 716–732.
9. Eisenberg T., Abdellatif M., Schroeder S., Primessnig U., Stekovic S., Pendl T., Harger A., Schipke J., Zimmermann A., Schmidt A., Tong M., Ruckenstuhl C., Dammbrueck C., Gross A.S., Herbst V., Magnes C., Trausinger G., Narath S., Meinitzer A., Hu Z., Kirsch A., Eller K., Carmona-Gutierrez D., Büttner S., Pietrocola F., Knittelfelder O., Schrepfer E., Rockenfeller P., Simonini C., Rahn A., Horsch M., Moreth K., Beckers J., Fuchs H., Gailus-Durner V., Neff F., Janik D., Rathkolb B., Rozman J., de Angelis M.H., Moustafa T., Haemmerle G., Mayr M., Willeit P., von Frieling-Salewsky M., Pieske B., Scorrano L., Pieber T., Pechlaner R., Willeit J., Sigrist S.J., Linke W.A., Mühlfeld C., Sadoshima J., Dengjel J., Kiechl S., Kroemer G., Sedej S., Madeo F. // *Nat. Med.* 2016. V. 22. № 12. P. 1428–1438. <https://doi.org/10.1038/nm.4222>
10. Eisenberg T., Knaue H., Schauer A., Büttner S., Ruckenstuhl C., Carmona-Gutierrez D., Ring J., Schroeder S., Magnes C., Antonacci L., Fussi H., Deszcz L., Hartl R., Schraml E., Criollo A., Megalou E., Weiskopf D., Laun P., Heeren G., Breitenbach M., Grubeck-Loebenstein B., Herker E., Fahrenkrog B., Fröhlich K-U., Sinner F., Tavernarakis N., Minois N., Kroemer G., Madeo F. // *Nat. Cell. Biol.* 2009. V. 11. P. 1305–1314. <https://doi.org/10.1038/ncb1975>
11. Ghosh I., Sankhe R., Mudgal J., Arora D., Nampoothiri M. // *Neuropeptides*, 2020. V. 83. P. 102083. <https://doi.org/10.1016/j>
12. Wirth A., Wolf B., Huang C.K., Glage S., Hofer S.J., Bankstahl M., Bär C., Thum T., Kahl K.G., Sigrist S.J., Madeo F., Bankstahl J.P., Ponimaskin E. // *GeroScience*. 2021. V. 43. P. 673–690. <https://doi.org/10.1007/s11357-020-00310-0>
13. Nakanishi S., Cleveland J.L. // *Med. Sci.* 2021. V. 9. № 2. P. 28. <https://doi.org/10.3390/medsci9020028>
14. Березов Т.Т., Коровкин В.Ф. // *Биохимия*. 1997. М.: Медицина, с. 325.
15. Pegg A.E. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 21. P. 14529–14532.
16. Pegg A.E. // *Chem. Res. Toxicol.* 2013. V. 26. № 12. P. 1782–1800.
17. Igarashi K., Kashiwagi K. // *Mol. Nutr. Food Res.* 2011. V. 55. № 9. P. 1332–1341.
18. Seller N. // *Neurochemical Research*. 2000. V. 25. № 4. P. 471–490.
19. Сулачев Д.Н. и др. // *Цитология*. 2018. Т. 60. № 3. С. 164–172.
20. Kahana C. // *J. Biol. Chem.* 2018. V. 293(48). P. 18730–18735. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.003339>
21. Soda K. // *Cells*. 2022. V. 11. P. 164. <https://doi.org/10.3390/cells11010164>
22. LLarqué E., Sabater-Molina M., Zamora S. // *Nutrition*. 2007. V. 23. № 1. P. 87–95.
23. Ramos-Molina B., Queipo-Ortur, M.I., Lambertos A., Tinahones F.J., Peñafiel R. // *Front. Nutr.* 2019. V. 6. № 24. P. 1–15. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00024>
24. Rika Hirano R., Shirasawa H., Kurihara S. // *Med. Sci.* 2021. V. 9. № 1. 8; <https://doi.org/10.3390/medsci9010008>
25. Murray-Stewart T., Dunworth M., Foley J.R., Schwartz C.E., Casero R.A. // *Med. Sci.* 2018. V. 6. № 4. 12. <https://doi.org/10.3390/medsci6040112>
26. Bupp C.P., Schultz C.R., Uhl K.L., Rajasekaran S., Bachmann A.S. // *AJMG*. 2018. V. 176. № 12. P. 2548–2553.
27. Jain V. // *Med. Sci.* 2018. V. 6. P. 4.
28. Marcoli M., Cervetto, C. Amato S., Fiorucci C., Maura G., Mariottini P., Cervelli M. // *Biomolecules*. 2022. V. 12. P. 204. <https://doi.org/10.3390/biom12020204>

29. Березов Т.Т., Маклецова М.Г., Федорова Т.Н. // *Анн. клин. эксперимент. неврол.* 2012. Т. 6. С. 38–43.
30. Березов Т.Т., Маклецова М.Г., Сяткин С.П., Рихирева Г.Т., Куликова О.И., Коновалова Е.В., Федорова Т.Н. // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2013. Т. 113. № 7. С. 65–70.
31. Скачков С.Н., Антонов С.М., Итон М.Дж. // *Биологические мембраны.* 2016. Т. 33. № 1. С. 3–31. <https://doi.org/10.7868/S0233475516010114>
32. Nakanishi S., Cleveland J.L. // *Medical Sciences.* 2021. V. 9. № 2. P. 28. <https://doi.org/10.3390/medsci9020028>
33. Kovács Z., Skatchkov S.N., Veh R.W., Szabó Z., Németh K., Szabó P.T., Kardos J., Héja L. // *Front. Cell. Neurosci.* 2022. V. 15. P. 787319. <https://doi.org/10.3389/fncel.2021.787319>
34. Makletsova M.G., Uskova N.I., Bondarenko T.I. // *Biokhimiia.* 1992. V. 57. № 9. P. 1348–1351.
35. Guerra G.P., Rubin M.A., Mello C.F. // *Pharmacol. Res.* 2016. V. 112. P. 99–118. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.023>
36. Moinard C., Cynober L., Bandt J.-P. // *Clinical Nutrition.* 2005. V. 24. № 2. P. 184–197.
37. Kirichenko E.Y., Churyumova G.A., Logvinov A.K. // *Biochem. Mosc. Suppl. Ser. Membr. Cell Biol.* 2016. V. 10. № 3. P. 207–217.
38. Benedikt J., Inyushin M., Kucheryavykh Y.V., Rivera Y., Kucheryavykh L.Y., Nichols C.G., Eaton M.J., Skatchkov S.N. // *Neuroreport.* 2012. V. 23. № 17. P. 1021–1025.
39. Laube G., Bernstein H.-G. // *Biochem J.* 2017. V. 474. P. 2619–2640.
40. Laube G., Veh R.W. // *Glia.* 1997. V. 19. P. 171–179.
41. Hamon L., Savarin P., Pastré D. // *Bioessays.* 2016. V. 38. № 6. P. 498–507.
42. Musa H., Fenn E., Crye M., Gemel J., Beyer E.C., Veenstra R.D. // *J. Physiol.* 2004. V. 557. P. 863–878.
43. Gemel J., Lin X., Veenstra R.D., Beyer E.C. // *J. Cell Sci.* 2006. V. 119. P. 2258–2268.
44. Skatchkov S.N., Bukauskas F.F., Benedikt J., Inyushin M., Kucheryavykh Y.V. // *Neuroreport.* 2015. V. 26. P. 528–532.
45. Kucheryavykh L.Y., Benedikt J., Cubano L.A., Skatchkov S.N., Bukauskas F.F., Kucheryavykh Y.V. // *Neuroreport.* 2017. V. 28. № 4. P. 208–213.
46. Wang Q., Wang W., Aten S., Kiyoshi C.M., Du Y., Zhou M. // *Brain Sci.* 2020. V. 10. № 4. P. 208.
47. Lopatin A.N., Makhina E.N., Nichols C.G. // *Nature.* 1994. V. 372. P. 366–369.
48. Lopatin A.N., Nichols C.G. // *Inward rectifiers in the heart: an update on I(K1).* *J Mol Cell Cardiol.* 2001. V. 33. № 4. P. 625–638.
49. Nichols C.G., Lee S.J. // *J. Biol. Chem.* 2018. V. 293. P. 18779–18788. <https://doi.org/10.1074/jbc.TM118.00334430333230>
50. Polis B., Karasik D., Samson A.O. // *Aging (Albany NY).* 2021. V. 13. № 7. P. 10770–10795. <https://doi.org/10.18632/aging.202928>
51. Dhara M., Matta J.A., Lei M., Knowland D., Yu H., Gu S., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 2799. <https://doi.org/10.1038/s41467020-16629-3>
52. Girardi B.A., Fabbrin S., Wendel A.L., Mello C.F., Rubin M.A. // *Psychopharmacology (Berl.).* 2020. V. 237. № 3. P. 681–693. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05403>
53. Geoffroy C., Paoletti P., Mony L. // *J. Physiology.* 2022. V. 600. № 2. P. 233–259.
54. Williams K., Romano C., Molinoff P.B. // *Mol. Pharmacol.* 1989. V. 36. № 317. P. 575–581.
55. Williams K., Dawson V.L., Romano C., Dichter M.A., Molinoff P.B. // *Neuron.* 1990. V. 5. № 318. P. 199–208.
56. Williams K., Zappia A.M., Pritchett D.B., Shen Y.M., Molinoff P.B. // *Mol. Pharmacol.* 1994. V. 45. P. 803–809.
57. Williams K. // *Neurosci. Lett.* 1995. V. 184. № 314. P. 181–184.
58. Williams K. // *Biochem. J.* 1997. V. 325. P. 289–297. <https://doi.org/10.1042/bj32502899230104>
59. Bowie D., Mayer M.L. // *Neuron.* 1995. V. 15. P. 453–462. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90049-77646897](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90049-77646897)
60. Benveniste M., Mayer M.L. // *J. Physiol.-Lond.* 1994. V. 464. P. 131–163.
61. Mony L., Zhu S., Car.valho S., Paoletti P. // *EMBO J.* 2011. V. 30. № 15. P. 3134–3146.
62. Rock D.M., Macdonald R.L. // *Mol. Pharmacol.* 1992. V. 41. P. 83–88.
63. Yadav M., Parle M., Jindal D.K., Sharma N. // *Biomed. Pharmacother.* 2018. V. 98. P. 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.016>
64. Sharma S., Kumar P., Deshmukh R. // *Neurochem. Int.* 2018. V. 116. P. 104–111.
65. Ferchmin P.A., Pérez D., Biello M. // *Brain Res.* 2000. V. 859. P. 273–79.
66. Маклецова М.Г., Федорова Т.Н. // *Живые и биокосные системы.* 2016. Вып. 17. <http://www.jbks.ru/archive/issue-17/article-2>.
67. Nakamura M., T. Uemura, R. Saiki et al., *Atherosclerosis.* 2016. V. 244. P. 131–137.
68. Ключников С.А. // *Неврологический журнал им. Л.О. Бадаляна.* 2020. Т. 1. № 3. С. 139–158.
69. Velloso N.A., Dalmolin G.D., Gomes G.M., Rubin M.A., Canas P.M., Cunha R.A., Mello C.F. // *Neurobiology of learning and memory.* 2009. V. 92. № 4. P. 574–580.
70. Buttner S., Broeskamp F., Sommer C., Markaki M., Habernig L., Alavian-Ghavanini A., Carmona-Gutierrez D., Eisenberg T., Michael E., Kroemer G., Tavernarakis N., Sigrist S.J., Madeo F. // *Cell Cycle.* 2014. V. 13. № 24. P. 3903–3908.
71. Limon A., Mamdani F., Hjelm B.E., Vawter M.P., Sequeira A. // *Neurosci. Biobehav. Rev.* 2016. V. 66. P. 80. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2013.04.00823632063>
72. Xianjian W., Cao W., Jia G., Zhao H., Chen X., Wu C., Tang J., Wang J., Liu G. // *Animal Nutrition.* 2017. V. 3. № 1. P. 85–90.
73. Saiki S., Sasazawa Y., Fujimaki M., Kamagata K., Kaga N., Taka H., Li Y., Souma S., Hatano T., Imamichi Y., Furuya N., Mori A., Oji Y., Ueno S.I., Nojiri S., Miura Y., Ueno T., Funayama M., Aoki S., Hattori N. // *Ann.*

- Neurol. 2019. V. 86. № 2. P. 251–263.
<https://doi.org/10.1002/ana.25516>
74. *Vrijzen S., Besora-Casals L., van Veen S., Zielich J., Van den Haute C., Hamouda N.N., Fischer C., Ghesquière B., Tournev I., Agostinis P., Baekelandt V., Eggermont J., Lambie E., Martin S., Vangheluwe P.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2020. V. 117. № 49. P. 31198–31207.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1922342117>
 75. *Makletsova M.G., Syatkin S.P., Poleshchuk V.V., Urazgildeeva G.R., Chigaleykh L.A., Sungrapova C.Y., Illarioshkin S.N.* // J. Neurology Research. 2019. V. 9. № 1–2. P. 1–7.
<https://doi.org/10.14740/jnr509>
 76. *Сяткин С.П., Свинарёв В.И.* // Вестник РУДН. 2010. Т. 1. С. 36–41.
 77. *Baroli G., Sanchez J.R., Agostinelli E., Mariottini P., Cervelli M.* // IJMM. 2019. P. 3–9. doi.org/.
<https://doi.org/10.3892/ijmm.2019.4401>
 78. *Chen G., Fiori L., Moquin L., Gratton A., Mamer O., Mechawar N., Turecki G.* // Neuropsychopharmacology. 2010. V. 35. № 7. P. 1477–1484.
<https://doi.org/10.1038/npp.2010.17>
 79. *Fiori L.M., Turecki G.* // J. Psychiatr. Res. 2011. V. 45. № 9. P. 1229–1235.
<https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2011.03.015>
 80. *Bernstein HG, Keilhoff G, Laube G, Dobrowolny H, Steiner J.* // World J. Psychiatr. 2021. V. 11. №. 12. P. 1177–1190.
 81. *Liu P., Jing Y., Zhang H.* // Neuroscience. 2008. V. 155. P. 789–796.
 82. *Nishimura K., Shiina R., Kashiwagi K., Igarashi K.* // J. Biochem. 2006. V. 139. P. 81–90.
 83. *Schroeder S., Hofer S.J., Zimmermann A., Pechlaner R., Dambroweck C., Pendl T., Marcello G.M., Pogatschnigg V., Bergmann M., Müller M., Gschiel V., Ristic S., Tadic J., Iwata K., Richter G., Farzi A., Üçal M., Schäfer U., Poglitsch M., Royer P., Mekis R., Agreiter M., Tölle R.C., Sótónyi P., Willeit J., Mairhofer B., Niederkofler H., Pallhuber I., Runger G., Tilg H., Defrancesco M., Marksteiner J., Sinner F., Magnes C., Pieber T.R., Holzer P., Kroemer G., Carmona-Gutierrez D., Scorrano L., Dengjel J., Madl T., Sedej S., Sigrist S.J., Rácz B., Kiechl S., Eisenberg T., Madeo F.* // Cell Repots. 2021. V. 35. № 2. P. 108985.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108985>
 84. *Liang Y.T., Piao C., Beuschel C.B., Toppe D., Kollipara L., Bogdanow B., Maglione M., Lützkendorf J., See J.C.K., Huang S., Conrad T.O.F., Kintscher U., Madeo F., Liu F., Sickmann A., Sigrist S.J.* // Cell Reports. 2021. V. 35. № 2. P. 108941.
 85. *Sharma P., Sharma R.* // Saudi J. Bio Sci. 2021. V. 28. № 12. P. 7046–7053.
 86. *Eisenberg T., Abdellatif M., Schroeder S., Primessnig U., Stekovic S. Pendl T., Harger A., Schipke J., Zimmermann A., Schmidt A., Tong M., Ruckenstein C., Dambroweck C., Gross A.S., Herbst V., Magnes C., Trausinger G., Narath S., Meinitzer A., Hu Z., Kirsch A., Eller K., Carmona-Gutierrez D., Büttner S., Pietrocola F., Knittelfelder O., Schrepfer E., Rockenfeller P., Simonini C., Rahn A., Horsch M., Moreth K., Beckers J., Fuchs H., Gailus-Durner V., Neff F., Janik D., Rathkolb B., Rozman J., de Angelis M.H., Moustafa T., Haemmerle G., Mayr M., Willeit P., von Frieling-Salewsky M., Pieske B., Scorrano L., Pieber T., Pechlaner R., Willeit J., Sigrist S.J., Linke W.A., Mühlfeld C., Sadoshima J., Dengjel J., Kiechl S., Kroemer G., Sedej S., Madeo F.* // Nat. Med. 2016. V. 22. № 12. P. 1428–1438.
<https://doi.org/10.1038/nm.4222>
 87. *Wirth M., Benson G., Schwarz C., Köbe T., Grittner U., Schmitz D., Sigrist S.J., Bohlken J., Stekovic S., Madeo F., Flöel A.* // Cortex. 2018. V. 109. P. 181–188.
 88. *Wirth M., Schwarz C., Benson G., Horn N., Buchert R., Lange C., Köbe T., Hetzer S., Maglione M., Michael E., Märtschenz S., Mai K., Kopp U., Schmitz D., Grittner U., Sigrist S.J., Stekovic S., Madeo F., Flöel A.* // Alzheimers Res. Ther. 2019. V. 11. № 1. P. 36.
<https://doi.org/10.1186/s13195-019-0484-1>
 89. *Pekar T., Wendzel A., Flak W., Kremer A., Pauschenwein-Frantsich S., Gschaidner A., Wantke F., Jarisch R.* // Wien Klin. Wochenschr. 2020. V. 132. № 1–2. P. 42–46.
<https://doi.org/10.1007/s00508-019-01588-7>
 90. *Pekar T., Bruckner K., Pauschenwein-Frantsich S., Gschaidner A., Oppliger M., Willesberger J., Ungersböck P., Wendzel A., Kremer A., Flak W., Wantke F., Jarisch R.* // Wien Klin Wochenschr. 2021. V. 133. № 9–10. P. 484–491.
 91. *Hirano R., Shirasawa H., Kurihara S.* // Med. Sci. 2021. V. 9. P. 8.
<https://doi.org/10.3390/medsci9010008>
 92. *Soda K., Uemura T., Sanayama H., Igarashi K., Fukui T.* // Med. Sci. 2021. V. 9. № 2. P. 22.
<https://doi.org/10.3390/medsci9020022>
 93. *Gilad G.M., Gilad V.* // Cell Mol. Neurobiol. 2003. V. 23. P. 637–649.
 94. *Gilad G.M., Gilad V.H.* // Brain Res. 2002. V. 5. P. 23–29.
 95. *Маклецова М.Г., Прокофьев В.Н., Пухирева Г.Т., Михалева И.И., Маркво Л.И., Кураев Е.Г.* // Новые лекарственные препараты. 2007. Т. 3. С. 33–43.
 96. *Randi A.S., Hernandez S., Sanchez M., Schwarcz M., Kleiman D., Pisarev D.L.* // Toxicol. Sci. 2003. V. 76. P. 291–298.
 97. *Sandusky-Beltran L.A., Kovalenko A., Ma C., Calahatian J.I.T., Placides D.S., Watler M.D., Hunt J.B., Darling A.L., Baker J.D., Blair L.J., Martin M.D., Fontaine S.N., Dickey C.A., Lussier A.L., Weeber E.J., Selenica M.B., Nash K.R., Gordon M.N., Morgan D., Lee D.C.* // Alzheimers Res. Ther. 2019. V. 11. № 1. P. 58.
<https://doi.org/10.1186/s13195-019-0507-y>
 98. *Sandusky-Beltran L.A., Kovalenko A., Placides D.S., Ratnasamy K., Ma C., Hunt J.B., Jr., Liang H., Calahatian J.I.T., Michalski C., Fahnestock M., Blair L.J., Darling A.L., Baker J.D., Fontaine S.N., Dickey C.A., Gamsby J.J., Nash K.R., Abner E., Selenica M.B., Lee D.C.* // J. Clin. Invest. 2021. V. 131. № 4. e126299.
<https://doi.org/10.1172/JCI126299>
 99. *Prokop J.W., Bupp C.P., Frisch A., Bilinovich S.M., Campbell D.B., Vogt D., Schultz C.R., Uhl K.L., Van-Sickle E., Rajasekara S., Bachmann A.S.* // Genes. 2021. V. 12. P. 470.
<https://doi.org/10.3390/genes12040470>
 100. *Signor C., Mello C.F., Porto G.P., Ribeiro D.A., Rubin M.A.* // Eur. J. Pharmacol. 2014. V. 730. P. 72–76.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.02.03524630833>

The Role of Polyamines in the Mechanisms of Cognitive Impairment

M. G. Makletsova^a, G. T. Rikhireva^b, E. Yu. Kirichenko^a, I. Yu. Trinitatsky^c,
M. Yu. Vakulenko^a, and A. M. Ermakov^a

^a Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russia

^b Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^c Rostov Regional Clinical Hospital, Rostov-on-Don, Russia

With aging, age-related cognitive impairments are becoming an increasingly pressing problem in society. Currently, the role of polyamines (putrescine, spermidine and spermine) in the pathogenesis of cognitive impairments of various origins is being actively discussed. It has been shown that the content of polyamines in the brain tissue decreases with age. Exogenous administration of polyamines avoids cognitive impairment and/or influence the pathogenetic processes associated with the progression of pathologies. There are 3 known ways of polyamines entering the human body: from food, synthesis by intestinal bacteria and their own biosynthesis in the body. Currently, one of the most promising approaches to the prevention of cognitive impairment is the use of foods with a high content of polyamines, as well as the use of various probiotics that affect intestinal bacteria that synthesize polyamines. Since 2018, projects have been launched in a number of European countries aimed at assessing the impact of a diet high in polyamines on cognitive processes. The review, based on the analysis of recent publications, presents material on the effect of polyamines on cognitive processes, the role of polyamines in the regulation of neurotransmitter processes, and also discusses the role of polyamines in cognitive disorders in mental and neurological diseases.

Keywords: cognitive impairment, polyamines, spermine, spermidine, putrescine

РАННИЙ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС ВЛИЯЕТ НА СОЦИАЛЬНОЕ ПОВЕДЕНИЕ ВЗРОСЛЫХ КРЫС: ЭФФЕКТЫ ПОЛА И БАЗОВОГО УРОВНЯ ИНТЕРЛЕЙКИНА 1-БЕТА В КРОВИ

© 2022 г. Н. Д. Брошевицкая¹, И. В. Павлова¹ *, М. И. Зайченко¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва, Россия

Поступила в редакцию 24.02.2022 г.

После доработки 25.02.2022 г.

Принята к публикации 03.03.2022 г.

Исследовали влияние активации иммунной системы в раннем онтогенезе (введение липополисахарида, ЛПС, на 3 и 5 день после рождения в дозе 50 мкг/кг) на различные аспекты социального поведения взрослых крыс самцов и самок: социальное взаимодействие и доминирование. Поведение крыс сопоставляли с уровнем кортикостерона и интерлейкина 1-β в сыворотке крови, взятой до начала тестирования. У самцов ЛПС группы по сравнению с контролем увеличивалось время взаимодействия в тесте на социальное взаимодействие, а также возрастала доля побед в тесте на социальное доминирование в трубе. Для победителей в тесте в трубе был характерен более высокий базовый уровень интерлейкина 1-β в сыворотке крови. У самок не наблюдалось изменений в социальном поведении после введения ЛПС в раннем онтогенезе. Полученные результаты свидетельствуют о влиянии раннего провоспалительного стресса на социальное поведение взрослых крыс самцов (но не самок) и ассоциации изменений поведения с базовым уровнем интерлейкина 1-β.

Ключевые слова: ранний провоспалительный стресс, липополисахарид, социальное взаимодействие, социальное доминирование, кортикостерон, интерлейкин-1β

DOI: 10.31857/S1027813322030025

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что стресс в раннем онтогенезе может оказать влияние на поведение взрослых особей и привести к серьезным нарушениям нормального развития гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой, иммунной и других систем организма [1–5]. В результате субъекты, перенесшие такой стресс, приобретают предрасположенность к развитию целого ряда психоневрологических заболеваний: депрессии, тревожным расстройствам, шизофренией, синдрому гиперактивности и дефициту внимания, симптомы которых могут проявляться уже во взрослой жизни, после повторного столкновения с негативными воздействиями. В экспериментах на животных в качестве модели раннего стресса часто используется нейровоспаление, вызываемое инъекцией бактериального липополисахарида (ЛПС), являющегося составным компонентом внешней части мембраны грамотрицательных бактерий и введение которого приводит к высвобождению большого числа эндогенных провоспалительных медиаторов (цитокины, хемокины

и др.) [6]. В настоящее время изучено влияние введения ЛПС в раннем онтогенезе на уровень тревожности, депрессивное поведение, а также на выработку и угашение различных видов оборонительных условных рефлексов [4, 7, 8]. Данные о влиянии раннего провоспалительного стресса на социальное поведение немногочисленны. Постнатальное системное введение ЛПС (на 3-й и 5-й постнатальные дни) либо не влияло на социальное взаимодействие [1], либо приводило к уменьшению времени социальных контактов у взрослых животных [9]. Однако в последующих работах более детальный анализ показал, что снижение социального взаимодействия происходило за счет контактов, направленных к животному с введением ЛПС [10]. В опытах с разрушением обонятельного эпителия было показано, что аверсию вызывал запах, исходящий от крыс ЛПС группы. В работах с ранним постнатальным введением ЛПС непосредственно в гиппокамп [11], было показано, что у взрослых крыс наблюдали дефициты в социальном поведении, ухудшение распознавания нового объекта, нарушение предимпульсного торможения и рост числа активной микроглии.

* Адресат для корреспонденции: 117865 Москва, ул. Бутлерова, д. 5а; тел.: 8 (495) 789-38-52 +2139; e-mail: pavlovfml@mail.ru.

Таким образом, следует признать, что вопрос о влиянии раннего постнатального провоспалительного стресса на социальное поведение изучен недостаточно, в частности нет данных о влиянии на социальную мотивацию и социальное доминирование. Вместе с тем, актуальность данной проблемы велика, поскольку известно, что хроническое введение ЛПС матери на разных сроках беременности (пренатальное введение) может приводить к существенным нарушениям социального поведения, а именно к расстройствам аутистического спектра [12–16] и появлению симптомов шизофреноподобных отклонений [17]. Вместе с тем, в литературе имеются данные о влиянии иммунной системы на социальное поведение, в частности на агрессию [18, 19]. На линиях высоко- и низкоагрессивных животных было показано, что высокие уровни провоспалительных цитокинов коррелировали с высоким уровнем агрессии [20, 21]. Похожие данные были получены и при исследовании пациентов с депрессией, которые демонстрировали повышенную агрессию и высокий уровень провоспалительных цитокинов [22]. На основании этих данных можно было предположить, что ранний провоспалительный стресс будет приводить к изменениям социального поведения.

Целью нашей работы стало исследование влияния раннего постнатального провоспалительного стресса на такие аспекты социального поведения взрослых крыс линии Вистар, как социальное доминирование и социальное взаимодействие. В задачи нашей работы входило: 1) подготовить экспериментальные группы животных, что включало в себя введение бактериального липополисахарида (группа ЛПС, 50 мкг/кг), либо физиологического раствора (группа ФИЗ, контроль) крысам на 3-й и 5-й день от рождения; 2) у взрослых крыс в группах ЛПС и ФИЗ сопоставить социальное взаимодействие в двухкамерном тесте, социальное доминирование в тесте в трубе; 3) сопоставить влияние провоспалительного стресса на социальное поведение самцов и самок; 4) провести биохимический анализ сыворотки крови на кортикостерон и интерлейкин-1 β и сопоставить результаты с поведением крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. В опытах участвовало 102 крысы линии Вистар в возрасте от 2.5 до 5.5 месяцев (58 самцов и 44 самки). Крысята (20 пометов) были выведены в виварии ИВНД и НФ от родителей, полученных из филиала “Столбовая” ФГБУН НЦБМТ ФМБА, Россия. На 3-й и 5-й день от рождения у половины крысят из помета вызывали провоспалительный стресс путем введения бактериального липополисахарида (ЛПС, от *Echerichia coli*, серотип O26:B6, Sigma) в

дозе 50 мкг/кг в объеме 10 мкл/г (группа ЛПС, всего 61 крысенок). Во время этой процедуры крысята отлучались от матери на 15–20 мин. Они взвешивались на электронных весах с точностью до 0.01 г и получали подкожную инъекцию ЛПС в холку с помощью инсулинового шприца. Крысята группы ЛПС дополнительно метились с помощью подкожного введения у основания хвоста 10 мкл черной краски (фирма Dynamic Color, цвет Triple Black), используемой для татуировок у людей. Другой половине крысят из помета в этом же возрасте подкожно вводили физиологический раствор в объеме 10 мкл/г (группа ФИЗ, контроль, всего 41 крысенок). При разделении пометов старались уравнивать число самцов и самок в группах ЛПС и ФИЗ. Разделение пометов делалось с целью ослабить влияние генетического фактора на результаты экспериментов. В возрасте 25 дней крысят отлучали от матери, и формировали клетки таким образом, что в одной клетке содержались 4–5 крысы одного пола из 2–3 пометов из одной группы (либо ЛПС, либо ФИЗ). В дальнейшем животных содержали в виварии при обычном 12-часовом световом режиме в свободном доступе к воде и стандартному корму. В экспериментах соблюдали принципы гуманности, изложенные в директивах Европейского Сообщества (2010/63/EU) и положения ИВНД и НФ РАН о работе с экспериментальными животными.

Иммуноферментный анализ крови. Забор крови проводили у крыс в возрасте 80 дней до начала проведения поведенческих тестов. Для этого крыс наркотизировали с помощью изофлуранового ингаляционного наркоза (Аэрран), на кончике хвоста делали косые надрезы скальпелем и собирали периферическую кровь в объеме 0.7–1 мл в микропробирки с ранее добавленным гепарином (10 μ л). Затем кровь центрифугировали 15 мин при 1500 g для получения сыворотки и отбирали аликвоты объемом 50 и 150 μ л. Аликвоты сыворотки хранили при –80°C до проведения иммуноферментного анализа.

Для определения уровня кортикостерона в сыворотке крови использовали наборы для иммуноферментного анализа (DRG, Германия), с помощью которых детектировали как свободный, так и связанный с транспортными белками кортикостерон методом конкурентного иммуноферментного анализа. Содержание провоспалительного интерлейкина-1 β (ИЛ-1 β) в сыворотке крови определяли с помощью наборов производства R&D Systems (США) согласно инструкции производителя. При дальнейшей статистической обработке из выборки исключали экстремумы.

Тестирование социального взаимодействия проводили в возрасте 100 дней в квадратном открытом поле (100 \times 100 \times 30 см), где около одной из стенок, посередине располагался пластиковый

отсек (21 × 21 × 14 см) с перфорированными стенками. Тест проводился в течение двух дней: в первый день внутренний отсек был пустой, во второй день в отсек заранее помещали интактную незнакомую крысу-гостя одного пола и возраста с исследуемой крысой. Поведение крысы регистрировали в течение 5-ти минут. Перед помещением в камеру животного другого пола кроме обычной влажной и сухой уборки лабиринт протирали 20% раствором этилового спирта. Самцы и самки тестировались в разные дни, и для переноски самцов и самок из вивария в экспериментальную комнату использовали разные клетки. Для регистрации поведения крыс использовали программы Etho Vision и Mediocruser. Анализировали время нахождения крысы в зоне взаимодействия (коридор шириной 13 см около внутреннего отсека), число и длительность взаимодействий (нос крысы вблизи стенки внутреннего отсека), пройденную дистанцию в зоне взаимодействия. Рассчитывали коэффициент времени взаимодействия $K_B = T_{B2}/T_{B1} \times 100\%$, где T_{B2} – время взаимодействия во второй, T_{B1} – в первый опыт. Такой же коэффициент рассчитывали по времени пребывания в зоне взаимодействия $K_{ЗВ} = T_{ЗВ2}/T_{ЗВ1} \times 100\%$, где $T_{ЗВ2}$ – время пребывания в зоне взаимодействия во второй опыт, $T_{ЗВ1}$ – в первый опыт.

Социальное доминирование оценивали в возрасте 110 дней при помощи тестирования в трубе из прозрачного оргстекла длиной 150 см и внутреннего диаметра 6 см. Эксперимент проводили в течение двух дней: в первый день животные исследовали новую обстановку и проходили по трубе в обоих направлениях, во второй проводили само тестирование. За день до начала эксперимента крыс взвешивали и формировали однополые пары так, чтобы одна крыса была из ФИЗ группы, другая из ЛПС группы, а вес у животных в паре не отличался более чем на 10 г. Во время тестирования крыс одновременно запускали с разных концов трубы, чтобы животные двигались друг-другу на встречу. “Победителем” считали то животное, которое смогло оттеснить оппонента назад и выйти с противоположного конца трубы. У каждой пары было две попытки, при этом каждую крысу запускали с разных концов трубы. Если в течение 2 мин не выявлялся “победитель”, считали, что ничья. Поведение регистрировали на цифровую видеокамеру Logitech C270 HD Webcam. Анализировали число и латентность побед у крыс в группе ФИЗ и ЛПС.

Статистическая обработка результатов. Для вторичной обработки результатов использовали стандартную программу STATISTICA 8.0. Распределение исследованных параметров было проверено на нормальность по критерию Колмогорова-Смирнова (Basic Statistics, раздел Descriptive Statistics). Если анализируемый параметр удовле-

творял данному критерию, то при сравнении групп крыс использовали дисперсионный анализ ANOVA, раздел *factorial ANOVA* и *Repeated measures ANOVA*. При *post-hoc* анализе применяли критерий *Newman-Keuls test*. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$, отмечали наличие тенденции при $0.05 \leq p < 0.1$. Во всех экспериментах анализировали влияние факторов ПОЛ, ГРУППА, в ряде случаев еще № теста. Для определения корреляционных связей между различными поведенческими показателями или между показателем поведения и уровнем кортикостерона/ИЛ-1 β строили корреляционные матрицы и рассчитывали коэффициенты корреляции (Basic Statistics). При отсутствии нормальности распределения поведенческих параметров использовали непараметрические методы анализа. При сравнении двух групп применяли *Mann-Whitney U Test*. При сравнении двух выборочных долей вариант использовали *2 × 2 Table* (Nonparametric Statistics), применяли критерий χ^2 . Данные на рисунках представлены в виде средних значений \pm ошибки средних.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Тест социального взаимодействия. Сопоставление поведения крыс в Тесте 1 (без крысы-гостя) и Теста 2 (с гостем во внутреннем отсеке) с помощью *Repeated measures ANOVA* выявило существенное влияние фактора № теста на время взаимодействия, время нахождения в зоне взаимодействия и пройденную дистанцию в зоне взаимодействия (табл. 1). Значения всех указанных показателей увеличивались в Тесте 2 по сравнению с Тестом 1 во всех группах, как у самцов, так и самок, что свидетельствовало о наличии социальной мотивации (рис. 1а, в, д). Фактор ПОЛ оказывал влияние на время взаимодействия и дистанцию в зоне взаимодействия (табл. 1), также наблюдалось взаимодействие факторов ПОЛ и № теста, у самок дистанция в зоне взаимодействия и время взаимодействия в тесте 2 были больше (рис. 1д), чем у самцов. Было обнаружено взаимодействие факторов № теста, ГРУППА и ПОЛ во влиянии на время взаимодействия (табл. 1). *Post hoc* анализ показал (рис. 1а), что в Тесте 2 у самцов группы ЛПС время взаимодействия было больше, чем в группе ФИЗ. Время нахождения в зоне взаимодействия в Тесте 1 было меньше у самцов из ЛПС группы (рис. 1в). Сопоставление коэффициентов времени взаимодействия (рис. 1б), а также коэффициентов времени пребывания в зоне взаимодействия (рис. 2а), показало, что у самцов ЛПС группы коэффициенты были больше (*Mann-Whitney U Test*, $U = 178$, $p = 0.002$; *Mann-Whitney U Test*, $U = 226$, $p = 0.017$ соответственно), чем у группы ФИЗ. У самок различий в коэффициентах взаимодействия не было обнаружено в группах ФИЗ и ЛПС. Полученные данные

Таблица 1. Значения F и p при анализе с помощью Repeated measures ANOVA показателей поведения в тесте на социальное взаимодействие

Показатель	Факторы					
	ПОЛ	№ теста	ГРУППА	№ теста × × ПОЛ	№ теста × × ГРУППА	№ теста × × ГРУППА × × ПОЛ
Время взаимодействия	$F_{1,88} = 7.19,$ $p = 0.009$	$F_{1,88} = 219.26,$ $p = 0.000$	—	$F_{1,88} = 4.62,$ $p = 0.034$	$F_{1,88} = 5.56,$ $p = 0.021$	$F_{1,88} = 4.75,$ $p = 0.032$
Время в зоне взаимодействия	—	$F_{1,88} = 130.78,$ $p = 0.000$	—	$F_{1,88} = 7.13,$ $p = 0.009$	$F_{1,88} = 8.86,$ $p = 0.004$	—
Дистанция в зоне взаимодействия	$F_{1,88} = 23.43,$ $p = 0.000$	$F_{1,88} = 130.97,$ $p = 0.0000$	—	$F_{1,88} = 23.54,$ $p = 0.000$	—	—

Примечание. Прочерк — статистически незначимое влияние фактора.

свидетельствуют о том, что ранний провоспалительный стресс оказал влияние на социальное взаимодействие только у самцов и привел к увеличению мотивации к взаимодействию.

Тест социального доминирования в трубе. Доля попыток, увенчавшихся победой, у самцов ЛПС группы была больше ($0.65, \chi^2 = 13.79, p = 0.0002, 2 \times 2$ Table, критерий χ^2), чем у самцов группы ФИЗ группы (0.35). У самок не было различий в числе победителей из ЛПС и ФИЗ групп (рис. 2а). Не было обнаружено различий в латентности “побед” у крыс группы ФИЗ и ЛПС (рис. 2б). Таким образом, ранний провоспалительный стресс увеличивал социальное доминирование только у самцов, не влияя на самок.

При сопоставлении результатов тестов социального взаимодействия и социального доминирования у самцов была обнаружена слабая, но статистически значимая положительная корреляция между числом побед в трубе и длительностью социального взаимодействия в Тесте 2 ($r = 0.291, p = 0.033$), что может говорить о высокой социальной мотивации у доминантных самцов. У самок не было обнаружено статистически значимой корреляции между данными показателями ($r = -0.182, p = 0.275$).

Сопоставление показателей социального поведения и биохимии крови. На рис. 3а и б представлены результаты сопоставления поведения в тесте на социальное доминирование и уровня кортикостерона и ИЛ-1 β в сыворотке крови. На уровень интерлейкина оказывал влияние фактор ПОЛ ($F_{1,51} = 13.78, p = 0.001$, Repeated measures ANOVA), у самцов уровень интерлейкина был выше, также наблюдалось взаимодействие фактора ПОЛ и ПОБЕДА ($F_{1,51} = 7.82, p = 0.007$). Post hoc анализ показал, что уровень интерлейкина-1 β был выше у самцов-победителей по сравнению с самцами-проигравшими (рис. 3а). У самок не наблюдалось различий в уровне интерлейкина-1 β у

проигравших и победителей (рис. 3а). На уровень кортикостерона оказывал влияние фактор ПОЛ ($F_{1,85} = 133.37, p = 0.000$). Уровень кортикостерона у самок был выше по сравнению с самцами. Post hoc анализ показал, что у победителей и побежденных не наблюдалось различий по уровню кортикостерона, как у самцов, так и самок (рис. 3б). Таким образом, для доминантных самцов характерен высокий уровень интерлейкина-1 β .

На рис. 4а и б представлены результаты корреляционного анализа между показателями поведения в Тесте 2 на социальное взаимодействие и уровнем кортикостерона и ИЛ-1 β в сыворотке крови. У самок была обнаружена статистически значимая положительная корреляция между длительностью взаимодействия в Тесте 2 и уровнем кортикостерона ($r = 0.52, p = 0.002$). У самцов была обнаружена тенденция к положительной корреляции между уровнем ИЛ-1 β и дистанцией в зоне взаимодействия в тесте 2 на социальное взаимодействие ($r = 0.39, p = 0.054$). Таким образом, высокая социальная мотивация коррелировала у самок с высоким уровнем кортикостерона, а у самцов — с высоким уровнем ИЛ-1 β .

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе впервые было показано, что введение ЛПС на ранних сроках постнатального развития приводит к увеличению социального доминирования у взрослых крыс самцов в тесте в трубе. Ранее увеличение социального доминирования наряду с увеличением агрессивного поведения наблюдали в модели депрессии, создаваемой с помощью хронического непредсказуемого стресса средней силы во взрослом возрасте [23], или в биохимической модели депрессии, вызываемой с помощью диеты с низким уровнем триптофана [24]. Травмы мозга в подростковом возрасте [25] также могли приводить к увеличению социального доминирования. Вместе с тем, содержание в обо-

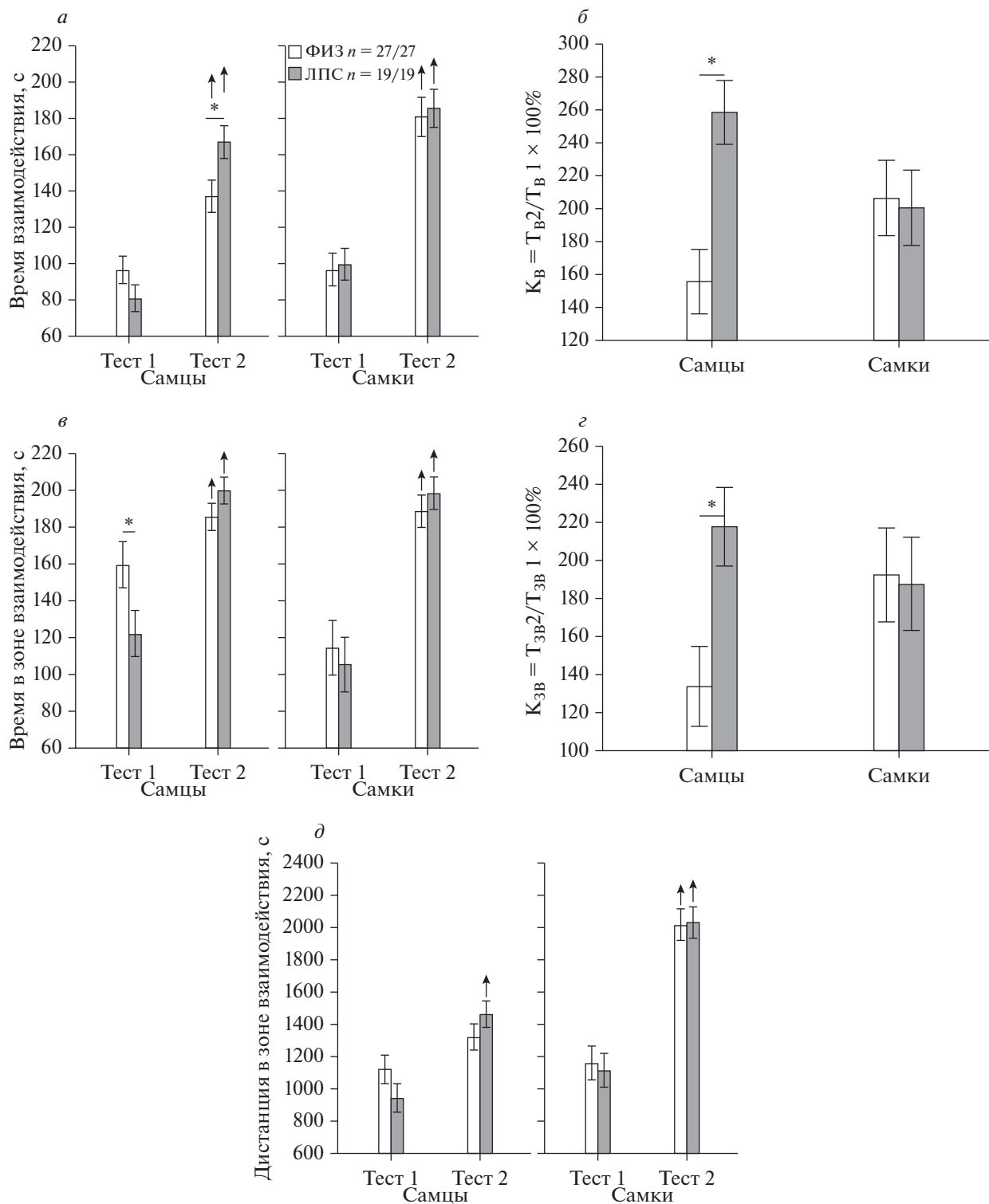


Рис. 1. Влияние раннего постнатального введения ЛПС на поведение взрослых крыс в тесте на социальное взаимодействие. ФИЗ – животные с введением физиологического раствора, ЛПС – крысы с введением ЛПС. Тест 1 – без крысы-гостя во внутреннем отсеке камеры. Тест 2 – с крысой-гостем. n – число крыс в группе (Самцы/Самки). ↑ – увеличение ($p < 0.05$) значений показателя поведения в Тесте 2 по сравнению с Тестом 1, * статистически значимые различия ($p < 0.05$) между группой ЛПС и ФИЗ (на *a, в, д* – Repeated measures ANOVA, post hoc анализ, на *б и г* – критерий Mann-Whitney U Test). n – число крыс самцы/самки.

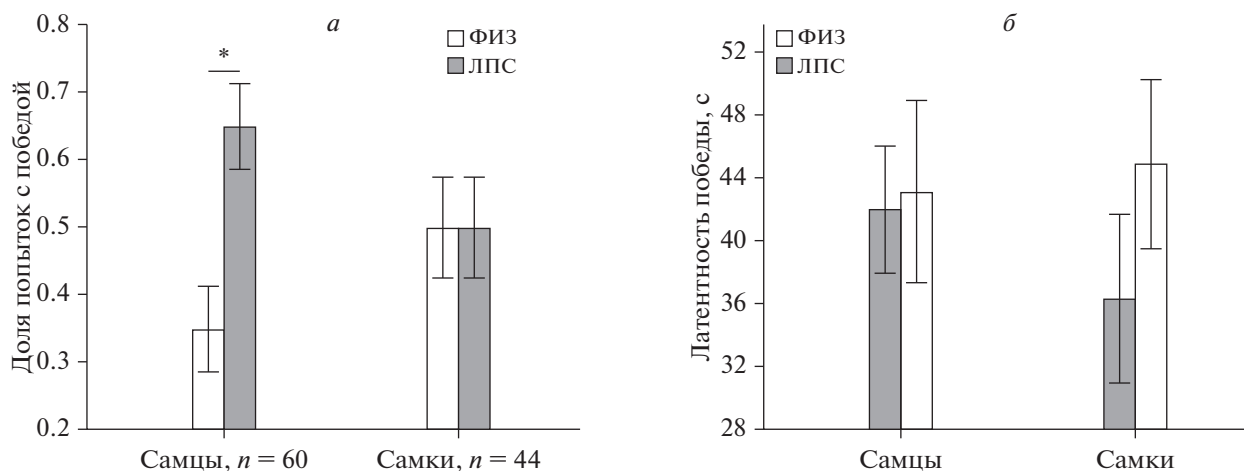


Рис. 2. Влияние раннего постнатального введения ЛПС на поведение взрослых крыс в тесте на социальное доминирование в трубе. n – число попыток. * Статистически значимые различия ($p < 0.05$) между группой ЛПС и ФИЗ (критерий χ^2 , 2×2 Table, Nonparametric Statistics). Остальные обозначения как на рис. 1.

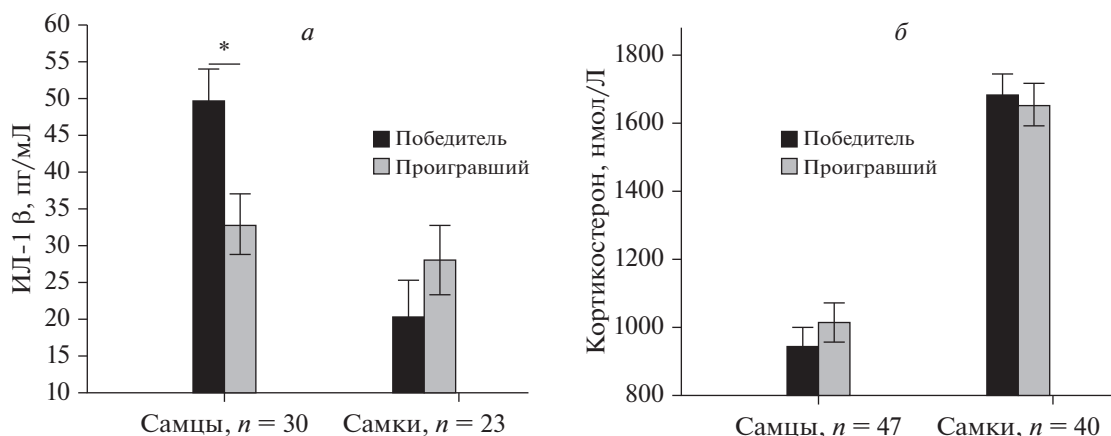


Рис. 3. Сопоставление уровня кортикостерона или ИЛ-1β в сыворотке крови у победителей и побежденных в тесте в трубе. * Статистически значимые различия между победителями и проигравшими (Factorial ANOVA, post hoc анализ).

гащенной среде [26], частое использование бегового колеса [27], хроническая боль [28], хронический стресс обездвижения [29], наоборот, были способны делать крыс более подчиненными в тесте в трубе. Необходимо отметить, что тест на социальное доминирование в трубе в настоящее время используется достаточно широко у грызунов, как в работах на крысах, так и мышах, при этом часто проводится сопоставление результатов с другими тестами на социальную доминантность (конкурентный поиск пищи, предпочтение при спаривании, тест теплого места, маркировка территории мочой и др.) [26, 30]. Считается, что тест на доминирование в трубе определяет территориальное доминирование, но не учитывает агрессию и может использоваться у животных, живущих группами [31]. Анализ нейронных механизмов социальной иерархии приводит к выводу о роли префронтальной коры в качестве центрального регулятора

[32]. Анализ транскриптома в медиальной префронтальной коре обнаружил различия в экспрессии определенных генов у доминантов и подчиненных [31], в частности различалась экспрессия вомероназальных и обонятельных рецепторов в коре мозга. Авторы приходят к выводу, что различные гены в медиальной префронтальной коре могут быть использованы как биомаркеры социального доминирования. Кроме того, обнаружена корреляция между социальным доминированием и фосфорилированием АМРА рецепторов в медиальной префронтальной коре, которое может также служить биомаркером социального доминирования [29].

Кроме увеличения социального доминирования самцы ЛПС группы в нашей работе показали увеличение социального взаимодействия в двухкамерном тесте по сравнению с контрольной группой. Корреляционный анализ показал наличие

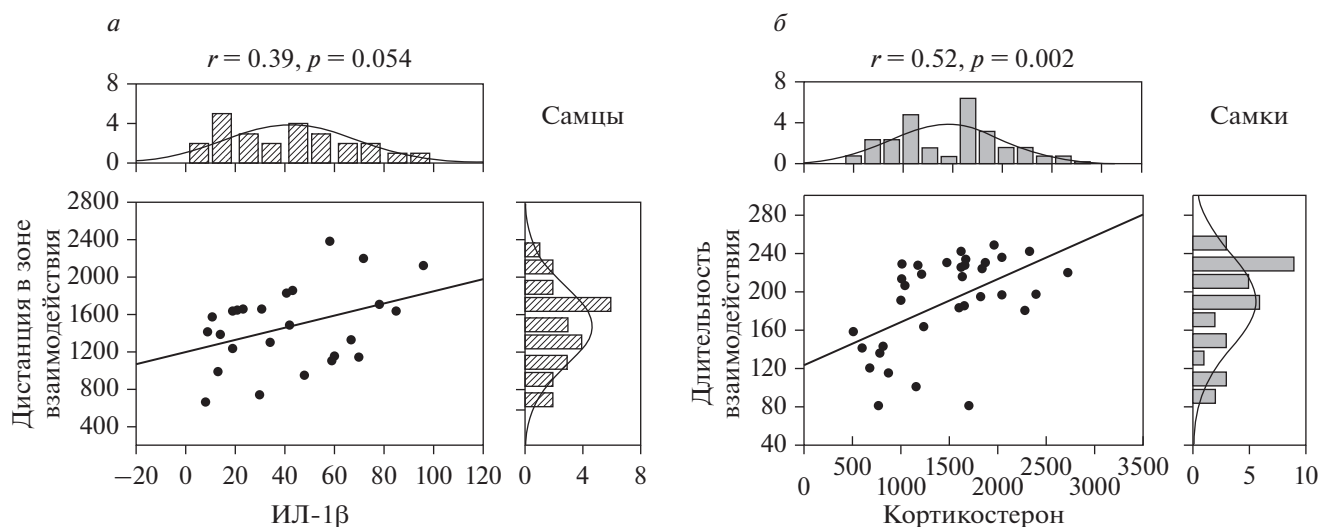


Рис. 4. Корреляционные матрицы между уровнем кортикостерона или ИЛ-1β в сыворотке крови и некоторыми показателями поведения в тесте на социальное взаимодействие. *r* – коэффициент корреляции.

корреляционной связи между числом побед в трубе и длительностью социального взаимодействия. Эти данные свидетельствуют о высокой социальной мотивации у доминантных самцов. В некоторых работах также была продемонстрирована связь между доминантностью и высокой социальной мотивацией [33], мыши высокого ранга больше времени взаимодействовали с незнакомой мышью, чем мыши низкого ранга. С исследовательской мотивацией авторы не увидели связи. В литературе имеются противоречивые данные относительно влияния раннего провоспалительного стресса на социальное взаимодействие крыс. В одной из первых работ [34] после введения ЛПС на 3 и 5 день после рождения у взрослых крыс наблюдалось уменьшение времени социального взаимодействия при нахождении опытной крысы в одной клетке с незнакомой крысой. В дальнейшем, было установлено, что социальное взаимодействие уменьшается за счет контактов, направленных на крысу из ЛПС группы [9]. Для проверки гипотезы о роли обонятельных сигналов, исходящих от крысы ЛПС группы, в социальной аверсии вызывали дегенерацию обонятельного эпителия с помощью интраназальной перфузии $ZnSO_4$ у партнера крысы ЛПС группы [9]. После такой процедуры увеличивалось число социальных контактов, направленных на крыс из ЛПС группы. Предполагалось наличие нарушений в содержании микробиоты кишечника крыс после неонатального воспаления, однако секвенирование РНК из фекальных болюсов не выявило отличий в бактериях самцов ЛПС группы [10]. Несмотря на это, лечение антибиотиками, вызывающими изменения в микробиоте, устраняло социальную аверсию. Как известно, крысы избегают общения с больными особями. Так, острое введение большой дозы ЛПС, вызывающей болезненное состояние у крысы,

приводило к подавлению социального взаимодействия в отношении больного партнера [35] и могло вызывать упреждающий иммунный ответ у здоровой крысы в виде увеличения содержания $TNF-\alpha$ в обонятельных луковицах.

Необходимо отметить, что в отличие от наших данных с ранним постнатальным введением ЛПС, активация иммунной системы матери (введение ЛПС беременным самкам) приводила к нарушениям социального поведения у потомства аутистического спектра. Самцы из такого потомства проводили меньше времени за активным социальным взаимодействием с незнакомой крысой, показали больше повторяющегося поведения, нарушения ультразвуковой коммуникации и имели отличия в бактериях в фекалиях, что характерно для аутистических заболеваний у людей [12, 14–16]. Кроме того, активация иммунной системы матери во время беременности могла приводить к шизофреноподобным изменениям в поведении потомства, о чем судили по дефициту предимпульсного торможения [17].

В нашей работе в ряде случаев была обнаружена связь между показателями социального поведения и уровнем кортикостерона и ИЛ-1β в сыворотке крови. Впервые было показано, что у самцов крыс победителей в тесте на социальное доминирование в трубе наблюдался более высокий уровень ИЛ-1β, чем у побежденных крыс. Уровень кортикостерона не отличался у победителей и побежденных, что согласуется с ранее полученными данными [26]. У крыс с высокой социальной мотивацией также наблюдался более высокий уровень ИЛ у самцов и более высокий уровень кортикостерона у самок. Необходимо напомнить, что биохимические показатели крови определялись задолго до начала социального тестирования и, возможно, способствовали проявлению осо-

бенностей социального поведения. Косвенным подтверждением наших результатов являются данные о том, что экспрессия маркера активации микроглии (IBA-1) и активации генов связанных с пролиферацией микроглии (CSF1 и IL-34) снижается в гипоталамусе при уменьшении доминирования у крыс после содержания в обогащенной среде [26], введение ингибитора микроглии уменьшало процент победителей в тесте в трубе. Ранее наблюдали увеличение уровня кортикостерона и ИЛ-6 в плазме после агрессивных схваток между мышами, причем уровень кортикостерона зависел от того, доминировали ли мыши в схватке или были в подчинении [36], у подчиненных мышей наблюдалось наибольшее повышение. В литературе имеются работы, в которых показана связь между доминантностью и агрессивностью, агрессию внутри группы обычно проявляет доминирующая особь [18, 37]. Имеются данные о связи агрессивности с повышенным уровнем провоспалительных цитокинов. На линиях высоко- и низкоагрессивных животных было показано, что высокие уровни провоспалительных цитокинов коррелировали с высоким уровнем агрессии [20, 21]. Сходные данные были получены и при исследовании пациентов с депрессией, которые демонстрировали повышенную агрессивность и высокий уровень провоспалительных цитокинов [22]. Исходя из этих данных, не кажется удивительным увеличение уровня ИЛ-1 β у крыс склонных к социальному доминированию.

В заключении необходимо отметить, что ранний провоспалительный стресс оказывал влияние только на самцов в тестах на социальное доминирование и взаимодействие. Ранее мы также наблюдали более выраженные изменения в тревожно-депрессивном поведении и оборонительном поведении самцов под влиянием введения ЛПС в раннем онтогенезе [7, 8]. Большая уязвимость самцов к влиянию ЛПС объясняется тем, что нейровоспалительный процесс протекает по-разному у самцов и самок [5]. У самцов и самок может различаться набор выделяемых цитокинов, их локализация и клеточный источник при нейровоспалении. У самцов микроглия является источником цитокинов при нейровоспалении, их экспрессия увеличивается после стресса, у самок не происходит увеличения выделения цитокинов из микроглии [38]. Кроме того эстрогены самок способны оказывать противовоспалительное влияние. Известно, что эстрогены ускоряют протекание воспалительного процесса в сторону его деактивации, большая роль при этом отводится противовоспалительному ИЛ-4 [39], и эстрогены способны затормозить выработку провоспалительных цитокинов [40].

ВЫВОДЫ

1. Введение ЛПС (50 мкг/кг) на 3 и 5 постнатальные дни приводило к увеличению социального доминирования у взрослых самцов в тесте в трубе по сравнению с контрольными крысами, которым вводили физиологический раствор.

2. Для самцов победителей в тесте в трубе был характерен более высокий базовый уровень интерлейкина 1- β в сыворотке крови по сравнению с побежденными крысами.

3. У самцов ЛПС группы по сравнению с контролем увеличивалось время взаимодействия в двухкамерном тесте на социальное взаимодействие, что свидетельствовало об увеличении социальной мотивации.

4. У самок не наблюдалось изменений в социальном доминировании и взаимодействии после введения ЛПС в раннем онтогенезе.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность М.В. Онуфриеву и Ю.В. Моисеевой, сотрудникам лаборатории функциональной биохимии нервной системы ИВНД и НФ РАН, за помощь в проведении иммуноферментного анализа.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания ИВНД и НФ РАН по теме “Фундаментальные нейробиологические механизмы поведения, памяти и обучения в норме и при патологии (номер государственной регистрации АААА-А17-117-92040002-6)” и при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-34-90022).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

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

Этическое одобрение. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Custódio C.S., Mello B.S.F., Filho A.J.M.C., de Carvalho Lima C.N., Cordeiro R.C., Miyajima F., Réus G.Z., Vasconcelos S.M.M., Barichello T., Quevedo J., de Oliveira A.C., de Lucena D.F., Macedo D.S. // Mol. Neurobiol. 2018. V. 55. № 5. P. 3775-3788.
2. Hohmann C.F., Odehede G., Naidu L., Koban M. // Ann. Psychiatry Ment. Health. 2017. V. 5. № 2. P. 1095.
3. van Bodegom M., Homberg J.R., Henckens M.J.A.G. // Front. Cell Neurosci. 2017. V. 11. P. 87.
4. Tishkina A., Stepanichev M., Kudryashova I., Freiman S., Onufriev M., Lazareva N., Gulyaeva N. // Behav. Brain Res. 2016. V. 304. P. 1-10.
5. Григорьян Г.А. // Успехи физиол. наук. 2020. Т. 51. № 1. С. 18-32.
6. Alexander C., Rietschel E.T. // J. Endotoxin Res. 2001. V. 7. P. 167-202.
7. Брошевицкая Н.Д., Павлова И.В., Зайченко М.И., Груздева В.А., Григорьян Г.А. // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2020. Т. 106. № 6 С. 1-20.

8. Брошевицкая Н.Д., Павлова И.В., Зайченко М.И., Онуфриев М.В., Моисеева Ю.В., Григорьян Г.А. // Журн. высш. нервн. деят. 2020. Т. 70. № 2. С. 261–278.
9. MacRae M., Kenkel W.M., Kentner A.C. // Brain Behav Immun. 2015. V. 49. P. 43–48.
10. Kentner A.C., Khan U., MacRae M., Dowd S.E., Yan S. // Physiol. Behav. 2018. V. 194. P. 311–318.
11. Zhu F., Zhang L., Ding Y.Q., Zhao J., Zheng Y. // Brain Behav. Immun. 2014. V. 38. P. 166–74.
12. Baharnoori M., Bhardwaj S.K., Srivastava L.K. // Schizophr. Bull. 2012. V. 38. № 3. P. 444–456.
13. Foley K.A., MacFabe D.F., Vaz A., Ossenkopp K.P., Kavaliers M. // Int. J. Dev. Neurosci. 2014. V. 39. P. 68–78.
14. Lee G.A., Lin Y.K., Lai J.H., Lo Y.C., Yang Y.S.H., Ye S.Y., Lee C.J., Wang C.C., Chiang Y.H., Tseng S.H. // Brain Sci. 2021. V. 11. № 8. P. 1085.
15. Xu X., Wu D., Hou S., Zhu J., Li J., Tang J. // Iran. J. Basic Med. Sci. 2017. V. 20. № 9. P. 1016–1020.
16. Kirsten T.B., Taricano M., Maiorka P.C., Palermo-Neto J., Bernardi M.M. // Neuroimmunomodulation. 2010. V. 17. P. 240–251.
17. Chamera K., Szuster-Głuszczyk M., Trojan E., Basta-Kaim A. // Cells. 2020. V. 9. № 7. P. 1676.
18. Кудрявцева Н.Н. // Нейробиология агрессии: мыши и люди. Новосибирск, Наука-Центр, 2013. 272 с.
19. Das S., Deuri S.K., Sarmah A., Pathak K., Baruah A., Sengupta S., Mehta S., Avinash P.R., Kalita K.N., Hazarika J. // J. Neuroimmunol. 2016. V. 292. P. 45–51.
20. Alperina E., Idova G., Zhukova E., Zhanaeva S., Kozhemyakina R. // Neurosci. Lett. 2019. V. 92. P. 193–198.
21. Idova G.V., Markova E.V., Gevorgyan M.M., Alperina E.L., Zhukova E.N. // Bull. Exp. Biol. Med. 2016. V. 160. № 5. P. 679–682.
22. Takahashi A., Flanigan M.E., McEwen B.S., Russo S.J. // Front. Behav. Neurosci. 2018 V. 12. P.56.
23. Yang C.R., Bai Y.Y., Ruan C.S., Zhou H.F., Liu D., Wang X.F., Shen L.J., Zheng H.Y., Zhou X.F. // Neurotox. Res. 2015. V. 27. № 2. P. 129–142.
24. Uchida S., Kitamoto A., Umeeda H., Nakagawa N., Masushige S., Kida S. // J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo). 2005. V. 51. № 3. P. 175–181.
25. Semple B.D., Canchola S.A., Noble-Haeusslein L.J. // J. Neurotrauma. 2012. V. 29. № 17. P. 2672–2683.
26. Cao W-Y, Hu Z.L., Xu Y., Zhang W.J., Huang F.L., Qiao X.Q., Cui Y.H., Wan W., Wang X.Q., Liu D., Dai R.P., Li F., Li C.Q. // Psychopharmacology (Berl). 2017. V. 234. № 22. P. 3321–3334.
27. Klomberg K.F., Garland T.Jr, Swallow J.G., Carter P.A. // Physiol. Behav. 2002. V. 77. № 1. P. 27–38.
28. Tansley S.N., Tuttle A.H., Wu N., Tohyama S., Dossett K., Gerstein L., Ham B., Austin J.S., Sotocinal S.G., Mogil J.S. // Genes. Brain Behav. 2019. V. 18. № 1. P. e12514.
29. Park M.J., Seo B.A., Lee B., Shin H.S., Kang M.G. // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. P. 15008.
30. Fan Z., Zhu H., Zhou T., Wang S., Wu Y., Hu H. // Nat. Protoc. 2019. V. 14. № 3. P. 819–831.
31. Pallé A., Zorzo C., Luskey V.E., McGreevy K.R., Fernández S., Trejo J.L. // FASEB J. 2019. V. 33. № 6. P. 6995–7008.
32. Wang F., Kessels H.W., Hu H. // Trends Neurosci. 2014. V. 37. № 11. P. 674–682.
33. Kunkel T., Wang H. // Behav. Brain Res. 2018. V. 15. № 336. P. 173–176.
34. Breivik T., Stephan M., Brabant G.E., Straub R.H., Pabst R., von Horsten B. // Brain Behav. Immun. 2002. V. 16. № 4. P. 421–438.
35. Hamasato E.K., Lovelock D., Palermo-Neto J., Deak T. // Physiol. Behav. 2017. V. 182. P. 128–136.
36. Audet M.-C., Mangano E.N., Anisman H. // Front. Behav. Neurosci. 2010. V. 4. P. 1–12.
37. Barabas A.J., Lucas J.R., Erasmus M.A., Cheng H.W., Gaskill B.N. // Front. Vet. Sci. 2021. V. 8. P. 695948.
38. Fonken L.K., Frank M.G., Gaudet A.D., D'Angelo H.M., Daut R.A., Hampson E.C., Ayala M.T., Watkins L.R., Maier S.F. // Brain Behav. Immun. 2018. V. 70. P. 257–267.
39. Villa A., Rizzi N., Vegeto E., Ciana P., Maggi A. // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 15224.
40. Najjar F., Ahmad M., Lagace D., Leenen F.H.H. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2018. V. 315. № 5. P. H1159–H1173.

Early Proinflammatory Stress Affects the Social Behavior of Adult Rats: Effects of Sex and the Baseline Level of Interleukin 1- β in the Blood

N. D. Broshevitskaya^a, I. V. Pavlova^a, and M. I. Zaichenko^a

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

The effect of activation of the immune system in early ontogenesis (administration of lipopolysaccharide, LPS, on the 3rd and 5th day after birth at a dose of 50 mcg/kg) on various aspects of the social behavior of adult male and female rats: social interaction and dominance was studied. The behavior of rats was compared with the level of corticosterone and interleukin 1-beta in the blood serum taken before the start of testing. The males of the LPS group had an increased interaction time in the social interaction test compared to the control, as well as the number of forwards in the social dominance tube test. The forwards in the tube test were characterized by a higher baseline level of interleukin 1- β in blood serum. In females, there were no changes in social behavior after the introduction of LPS in early ontogenesis. The results obtained indicate the influence of early proinflammatory stress on the social behavior of adult male rats (but not females) and the association of behavior changes with the baseline level of interleukin 1- β .

Keywords: early pro-inflammatory stress, lipopolysaccharide, social interaction, social dominance, corticosterone, interleukin-1 β

УДК 612.83

АНАЛЬГЕТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПАЛЬМИТОИЛЭТАНОЛАМИДА ПРИ РАЗВИТИИ НЕЙРОПАТИЧЕСКОЙ БОЛИ У КРЫС

© 2022 г. Д. Н. Ивашкевич¹, *, И. В. Манжуло¹, А. И. Пономаренко¹,
А. А. Тыртышная¹, И. В. Дюйзен¹

¹ Национальный научный центр морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН, Владивосток, Россия

Поступила в редакцию 22.03.2022 г.

После доработки 23.03.2022 г.

Принята к публикации 30.05.2022 г.

Анальгетическая активность пальмитоилэтаноламида (ПЭА, C₁₈H₃₇NO₂) изучалась с использованием модели повреждения седалищного нерва у крыс. В исследовании был использован комплекс физиологических, биохимических и иммуногистохимических методов выявления активности микро- и астроглии, а также нейрональной формы NO-синтазы. В работе установлено, что введение ПЭА (100 мг/кг) снижает интенсивность и продолжительность нейрогенного болевого синдрома и приводит к более ранней стабилизации распределения веса. Пероральное введение ПЭА стабилизирует уровень активности микро-, астроглии и nNOS-позитивных нейронов в задних рогах спинного мозга и спинномозговых ганглиях. Кроме того, в культуре клеток микроглии (SIM-A9) ПЭА ингибирует выработку ЛПС-индуцированных провоспалительных цитокинов (TNFα), маркера главного комплекса гистосовместимости (MHC II) и маркера клеточной поверхности провоспалительной микроглии (CD86), а также усиливает продукцию противовоспалительного интерлейкина-10 (IL10) и маркера клеточной поверхности противовоспалительной микроглии (CD206). Результаты данного исследования свидетельствуют о комплексном воздействии ПЭА на процесс нейровоспаления, что вероятно обеспечивает его анальгетический потенциал.

Ключевые слова: нейропатическая боль, спинной мозг, спинномозговые ганглии, пальмитоилэтаноламид, ПЭА, астроглия, микроглия, nNOS, цитокины

DOI: 10.31857/S1027813322030049

ВВЕДЕНИЕ

Лечение хронической боли является одной из наиболее актуальных проблем фундаментальной и практической нейробиологии. Трудности, связанные с лечением нейропатического болевого синдрома обусловлены разнообразием причин, способствующих его развитию, сложностью и недостаточным пониманием физиологических и психологических процессов, формирующих ощущение боли [1]. Хроническая боль, может способствовать развитию и прогрессированию большинства соматических заболеваний [2–4]. Современные методы лечения нейропатических болевых синдромов весьма ограничены [5, 6]. Разработка новых и эффективных методов лечения хронической боли требует более четкого представления о ее физиологических, биохимических и психофизиологических механизмах и способах ее эндогенного подавления.

Ранее было показано, что повреждение седалищного нерва вызывает повышение активности ноцицептивных нейронов в задних рогах спинного мозга и спинномозговых ганглиях. Система синтеза оксида азота (NO) претерпевает количественные

и качественные изменения при хронических болевых состояниях и лежит в основе болевого поведения, такого как термическая аллодиния [7]. Изменения нейротрансмиттерной активности нейронов спинного мозга и спинномозговых ганглиев сопровождаются активацией астроглии и микроглии [8]. После активации глиальные клетки продуцируют ряд провоспалительных цитокинов, которые активируют сенсорные нейроны в спинном мозге, тем самым усиливая ноцицептивную активность. Клетки микроглии подразделяют на две функциональные категории: активированный провоспалительный фенотип M1, характеризующийся провоспалительной активностью (TNFα, IL1β, IL6) и альтернативно активированный фенотип M2, характеризующиеся противовоспалительным медиаторным профилем (IL4, IL10) участвующим в процессах репарации и ремоделирования ткани [9]. Регуляция глиальной активности, представляет собой перспективную терапевтическую стратегию, поскольку можно модулировать иммунный ответ, не исключая его нейропротекторные функции.

Традиционный подход к лечению периферической нейропатической боли включает прегабалин (аналог гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК)), габапентин (ингибитор ГАМК), дулоксетин (ин-

* Адресат для корреспонденции: 690041 Россия, Владивосток, ул. Пальчевского, 17, e-mail: owncean@yandex.ru.

гибитор обратного захвата серотонина и норадреналина) и различные трициклические антидепрессанты в качестве вариантов лечения первой линии. Препараты второй линии для лечения нейропатической боли включают капсаицин [10], пластыри с лидокаином и трамадол (опиоидный агонист и ингибитор обратного захвата серотонина-норадреналина), тогда как сильные опиоиды могут использоваться в качестве лечения третьей линии. Однако, использование большинства из представленных на сегодняшний день препаратов сопровождается высоким риском развития побочных эффектов и привыкания. Поэтому, для терапии нейропатического болевого синдрома значительный интерес представляют вещества липидной природы, полученные из морских гидробионтов, демонстрирующие полную безопасность, и при этом противовоспалительную и нейропротекторную активность. Пальмитоилэтаноламид (ПЭА) является одним из представителей группы неэндоканнабиноидных амидов жирных кислот, он участвует в широком спектре защитных процессов при повреждении центральной и периферической нервной системы и/или при развитии нейровоспаления. На сегодняшний день уже представлено несколько лицензированных пищевых добавок, потенциально полезных в широком диапазоне терапевтических эффектов. Для ПЭА основным изученным действием является его противовоспалительная активность [11, 12], а также нейропротекторное действие и защита от эксайтотоксичности, осуществляемые за счет модуляции тучных клеток [13, 14]. Кроме того, ПЭА обладает анальгетическим действием, однако механизмы, реализующие данный эффект на сегодняшний день, остаются мало изученными. Известно, что ПЭА имеет опосредованное влияние на эндоканнабиноидные рецепторы CB1 и CB2. Обладая слабым сродством к каннабиноидным рецепторам, ПЭА может косвенно их активировать, выступая в качестве ложного субстрата для гидролазы амидов жирных кислот (ФААН), фермента, участвующего в деградации эндоканнабиноидного анандамида [13, 15]. Что приводит к повышению уровня анандамида и, в свою очередь, к повышенной активации передачи сигналов, опосредованных каннабиноидными рецепторами.

В настоящем исследовании мы проверяем гипотезу о том, что анальгетическое действие ПЭА реализуется путем направленной модуляции микро- и астроглиальной активности и продукции цитокинов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Способ получения пальмитоилэтаноламида (ПЭА)

Для получения этилового эфира пальмитиновой кислоты (ЭЭПК), к пальмитиновой кислоте добавляли безводный этанол в соотношении 1 : 2, с добавлением серной кислоты в качестве катализатора (1% от массы реакционной смеси), выдерживали при 75°C и перемешивали в течение 2 ч.

Полученный ЭЭПК промывали 1% раствором NaCl до нейтрального значения pH. Далее к ЭЭПК прибавляли моноэтаноламин в соотношении 1 : 2, с добавлением 3% раствора этилата натрия в этаноле в качестве катализатора (10% от массы реакционной смеси) и выдерживали при 75°C и перемешивали в течение 4 ч. Полученный этаноламид пальмитиновой кислоты промывали от остатков моноэтанол-амина 1% раствором NaCl до нейтрального значения pH. Полученный пальмитоилэтаноламид представлял собой белый рассыпчатый порошок без запаха, чистотой 99.6%.

Характеристика экспериментального материала

Исследование выполнено на самцах крыс (2–3 месяца, 240–260 г), содержащихся в условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Животных содержали при постоянной температуре (23 ± 2°C) и влажности (55 ± 15%) с 12-часовым циклом день/ночь. Животные получали стандартную диету (корм Дельта Фидс, БиоПро). Все экспериментальные манипуляции с животными одобрены комиссией по биомедицинской этике Национального научного центра морской биологии им. А.В. Жирмунского ДВО РАН.

Перед проведением операции животных анестезировали 4.5% изофлураном в 100% кислороде (система анестезии (Harvard Apparatus, США)). Животные были разделены на три группы ($n = 15$), по 5 крыс в группе: №1 – группа “ЛО” (животным проводили рассечение кожи и мышц бедра, но не накладывались лигатуры на седалищный нерв), №2 – группа “Боль” (животным накладывали три тугие лигатуры на седалищный нерв правой задней лапы) и №3 – группа “Боль + ПЭА” (животным накладывали три тугие лигатуры на седалищный нерв и вводили ПЭА). Препарат ПЭА вводили перорально (с помощью пищеводного зонда) в дозировке 100 мг/кг (в виде суспензии с питьевой водой) ежедневно в течение 14 дней. Животные групп “ЛО” и “Боль” получали перорально питьевую воду в том же режиме. Пальмитоилэтаноламид предоставлен для исследования, сотрудниками лаборатории фармакологии ННЦМБ ДВО РАН.

Физиологическое тестирование

Все поведенческие тесты выполнены с использованием специализированного оборудования. Функциональные тесты проводились раз в 3 дня после операции, каждое животное тестировалось три раза с интервалом 10 мин между измерениями. Поведение животных тщательно контролировалось на всех этапах эксперимента.

Инвалидность. Распределение нагрузки на задние конечности исследовали с помощью тестера инвалидности (Incapacitance tester, Columbus Instruments, США). Крыс помещали в камеру, предназначенную для размещения правой и левой задней конечностей на отдельных сенсорных па-

нелях. Сила, которую животное оказывало на правую и левую сенсорную панели при спокойном положении животного с упором на задние конечности, измерялась в граммах в течение 3 с. Для каждой крысы было получено три значения, затем данные были усреднены для определения распределения массы тела на каждой лапе. Распределение веса на правой и левой конечностях (в граммах) выражали в процентах.

Холодовая и тепловая аллодиния. Исследование холодовой и тепловой аллодинии проводили с помощью холодной/горячей пластины (Columbus Instruments, США). Испытание температурной аллодинии проводили в камере с 30 см акриловыми стенками на металлической пластине 30×30 см, охлажденной до 0°C (холодовая аллодиния) или разогретой до 54°C (тепловая аллодиния). Для количественной оценки данного параметра время отсутствия контакта конечности с холодной пластиной регистрировали в течение 60 с, а с горячей пластиной в течение 30 с, чтобы исключить повреждение тканей стопы.

Иммуногистохимическое и гистологическое исследование

Поясничный сегмент спинного мозга и спинномозговые ганглии для последующего иммуногистохимического исследования извлекали через 14 дней после операции. Для этого животных анестезировали 4.5% изофлураном в 100% кислороде (система анестезии (Harvard Apparatus, США)), затем перфузировали 10% раствором забуференного формалина и извлекали материал. Поясничный сегмент спинного мозга и дорсальные ганглии фиксировали в течение 24 ч при 4°C в 10% забуференном формалине. После 3–4-кратной промывки 0.1 М фосфатным буфером (рН 7.2) образцы биоматериала заливали в парафин по стандартному протоколу.

Для выявления микроглии был использован иммунопероксидазный метод с применением первичных антител к *iba-1*, 1 : 1000, Abcam (ab178846), Великобритания), для выявления астроцитов использовали антитела к глиальному фибриллярному кислом белку (GFAP, 1 : 2000, Sigma Aldrich (AMab91033)), для выявления нейрональной формы NO-синтазы использовали антитела к nNOS (Sigma Aldrich (07-571-I)). Вторичные антитела, меченные пероксидазой хрена (Vector Laboratories, PI-1000 (против кролика), PI-2000 (против мыши) 1 : 200), использовали в соответствии с инструкциями фирмы-производителя.

Парафиновые срезы спинномозговых ганглиев и поясничного сегмента спинного мозга (7 мкм) после депарафинирования инкубировали в 3% перекиси водорода для блокирования эндогенной пероксидазы. После трех промывок в 0.1 М фосфатном буфере (рН 7.2) срезы обрабатывали в течение 60 мин в 2% растворе бычьего сывороточного альбумина (Санта-Крус, SC-2323, США) и

0.25% Тритона X-100 (Gerbu, США). Инкубация с первичными антителами проводилась во влажной камере при 4°C в течение 24 ч. После 3 промывок срезы инкубировали во вторичных антителах в течение 60 мин, затем проводили трехкратную промывку фосфатным буфером (рН 7.2). Для проведения иммунопероксидазной реакции использовали хромоген (Nova Red, Vector Laboratories, США) в течение 5–10 мин. Затем срезы промывали 0.1 М фосфатным буфером (рН 7.2), обезвоживали и заключали в бальзам.

Для гистологического окрашивания депарафинированные срезы спинномозговых ганглиев помещали на 2 мин в раствор толуидинового синего (Bio Vitrum), обезвоживали, просветляли и заключали в бальзам.

Количественная обработка данных

Оценку площади иммуногистохимического окрашивания микроглии и астроглии, а также количества nNOS-позитивных нейронов в задних рогах спинного мозга (ипсилатеральная сторона) и спинномозговых ганглиях проводили в каждом десятом серийном срезе с использованием пакета программ ImageJ 1.41 (NIH, США). Количество nNOS-позитивных нейронов/ мм^3 рассчитывали по формуле: $d = (10^9 \times n) / (S \times 7)$, где d - плотность клеток; 10^9 - коэффициент пересчета мкм^2 в мм^3 ; n - количество иммунопозитивных клеток; S - площадь области интереса (мкм^2); 7 - толщина среза (мкм). Отношение площади исследуемой области интереса к площади иммунопозитивного окрашивания выражали в процентах.

Культура микроглии

Во всех экспериментах *in vitro* использовали линию мышинных микроглиальных клеток SIM-A9 (CRL-3265), полученную из Американской коллекции типовых культур. Клетки культивировали в стандартной среде DMEM, содержащей 10% FBS, 5% DHS и 0.5% пенициллин/стрептомицин, при 37°C в увлажненной атмосфере с 5% CO_2 . Каждый эксперимент *in vitro* проводился независимо не менее трех раз.

Вестерн-блоттинг

Клетки микроглии высевали в 6 луночные планшеты в количестве 1×10^9 клеток и обрабатывали ПЭА (0.1, 1, 10 мкМ) в течение 24 ч, снимали, а затем подвергали ультразвуковой гомогенизации в фосфатном буфере (7.2 рН) с добавлением 0.150 мМ ингибитора сериновых протеаз. После чего проводили измерение концентрации белка с последующим выравниванием до значений 2 мг/мл. Затем пробы разбавляли в соотношении 1 : 1 со стоквым загрузочным буфером (1 × Sample buffer - Biorad), содержащим 5% 2-меркаптоэтанол, после чего помещали на водяную баню при температуре

94.5°C на 5 мин. Электрофорез проводили с помощью системы Biorad, с использованием готовых гелевых картриджей (Protean mini gel Any kDa (Biorad)) и молекулярной лестницы (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo Fisher)), нагрузка на одну лунку составляла 60 мкг белка, сила тока на один гель — 15 мА. После электрофореза осуществляли перенос белков на PVDF мембрану с помощью системы переноса Turbo transblot (Biorad). Все материалы для проведения переноса использовали из набора Transblot Turbo RTA Transfer kit (Biorad). По завершении переноса мембраны помещали в блокирующий буфер (фосфатный буфер с содержанием 2% БСА, 0.1% Tween 20, 0.05% Triton X100) на ночь. На следующий день промывали от блокирующего буфера, после чего инкубировали 1 ч с первичными антителами к ASAH1 (1 : 1000, Santa Cruz (sc-100470)); β -actin (1 : 5000, Thermo Fisher (MA5-15739)); IL10 (1 : 1000, Thermo Fisher (ARC0102)) и CD206 (1 : 1000, Abcam (ab64693)). После инкубации мембраны снова промывали фосфатным буфером, далее час инкубировали со вторичными кролическими (Vector laboratories, PI-1000) и мышиными антителами (Vector laboratories, PI-2000), а затем промывали. Для проведения реакции хемилюминесценции использовался Western Blot ECL Substrate (Biorad) — в количестве 1 мл субстрата на одну мембрану, инкубация проводилась в течение 5 мин. Визуализация осуществлялась с использованием системы гель-документации ChemiDoc (Biorad). Полученные изображения анализировались с использованием пакета программ ImageLab.

Иммуноферментный анализ (ИФА).

Для количественной оценки TNF α , МНС II и CD86 был проведен иммуноферментный анализ с использованием клеток микроглии мыши SIM-A9. Клетки были разделены на 3 группы: интактные клетки, клетки обработанные ЛПС в концентрации 1 мкг/мл, и клетки обработанные ЛПС + ПЭА в концентрации 10 мкМ. Обработанную культуру клеток гомогенизировали на льду в буфере для экстракции (100 мМ Трис, рН 7,4, 150 мМ NaCl, 1 мМ EGTA, 1 мМ EDTA, 1% Triton X-100 и 0.5% дезоксихолата натрия) с 1 мг/мл смеси ингибиторов протеаз (Complete; Sigma-Aldrich, США) и 0.01 мг/мл смеси ингибиторов фосфатазы (P5726; Sigma-Aldrich). Использовались готовые ИФА наборы для определения TNF α (Abcam, ab208348), МНС II (Abcam, ab233629) и CD86 (LSBio, LS-F15288). Набор для анализа белка БСА (Pierce, Rockford, IL, USA) использовали для определения общей концентрации белка. Поглощение при 450 нм измеряли с помощью считывающего устройства для микропланшетов iMark (Bio-Rad, США).

Статистическая обработка данных

Оценку достоверности различий данных, проводили с использованием Two-way Anova (Bonferroni post test). Все данные были проверены на нормальность распределений с использованием теста Колмогорова-Смирнова. Данные выражали как среднее \pm SEM, $p < 0.05$ было принято как статистически значимое. Все статистические тесты выполнялись с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 4.00 (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анальгетическое действие пальмитоилэтанол амида обусловлено снижением процессов периферической сенситизации

Тестирование на холодовую аллодинию показало сокращение латентного периода подъема поврежденной конечности в группе “Боль” (31.8 ± 1.5 с) на следующий день после операции в сравнении с группой “ЛО” (60 с). Этот параметр в дальнейшем имел неравномерную динамику и до конца наблюдения не сопровождался восстановлением интактного уровня чувствительности к холодовому воздействию (18.6 ± 1.5 с и 27 ± 0.4 с для второго и третьего измерения, соответственно). У животных, получавших после операции препарат ПЭА, латентный период подъема лапы незначительно снижался (52 ± 1.2 с) по сравнению с ложнооперированными животными, начиная с 1-х суток наблюдения, и сохранял высокие значения на всем протяжении эксперимента (рис. 1а).

Увеличение латентного периода подъема лапы в тесте “горячая пластина” было не так отчетливо и носило волнообразный характер. Тем не менее, у животных группы “Боль + ПЭА” также наблюдалось достоверное увеличение по сравнению с группой “Боль” в первые трое суток после операции (15.8 ± 3 с для группы “Боль” и 23.8 ± 3 с для группы “Боль + ПЭА”), при этом в группе “ЛО” все животные выдерживали максимальный период измерения (30 с), данные различия наблюдались в течение всего периода наблюдения (рис. 1б).

Ложнооперированные животные симметрично распределяли свой вес на задние конечности, симметрия распределения веса сохранялась на всем протяжении эксперимента ($47.56 \pm 1 : 52.44 \pm 1\%$). У животных группы «Боль» показатели асимметрии в использовании задних конечностей в разные послеоперационные сроки имел нарастающую динамику в течение всего периода наблюдения и имел достоверные отличия от животных группы “ЛО”. На следующий день после операции животные в группе “Боль” распределяли большую часть своего веса на неповрежденной лапе ($74.26 \pm 0.5\% : 25.74 \pm 1\%$). К концу периода наблюдения распределение веса в группе “Боль” составило $80.75 \pm 1 : 19.25 \pm 1\%$, т.е. сохранилась тенденция к перераспределению веса на неповрежденную конечность. При использовании ПЭА установле-

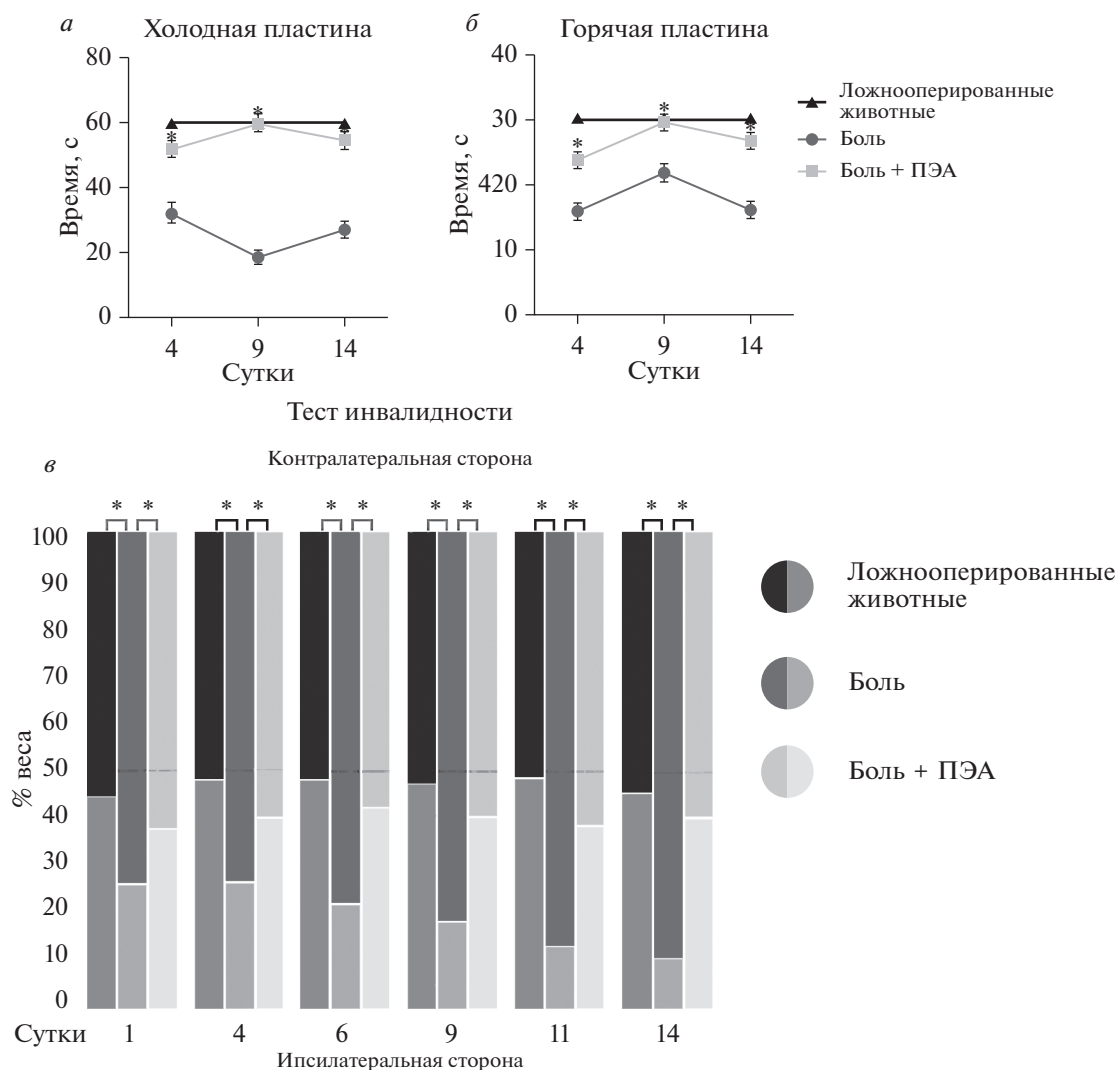


Рис. 1. Динамика болевого поведения у животных с моделью нейропатической боли и при введении ПЭА. *а* – тест “холодная пластина”; *б* – тест “горячая пластина”; *в* – тест инвалидности. Данные представлены как среднее значение \pm SEM, * достоверные различия с группой “Боль” (при $p < 0.05$).

но, что выраженность асимметрии при нагрузке на задние конечности достоверно отличается от животных группы “Боль” на всех этапах наблюдения. Животные в группе “Боль + ПЭА” в течение всего срока наблюдения демонстрировали более симметричные показатели в пределах $-60.36 \pm 1 : 39.64 \pm 1\%$ (рис. 1*в*).

Пальмитоилэтаноламид снижает общую глияльную активность в спинальных центрах регуляции болевого синдрома

Спинномозговые ганглии. При перевязке седалищного нерва у животных группы “Боль” количество сателлитных клеток окрашенных толуидиновым синим в ипсилатеральных ганглиях увеличивается, они начинают располагаться в 2–3 слоя вокруг нейронов всех калибров. В группе “Боль”

количество клеток-сателлитов нейронов больших, средних и малых размеров возрастает соответственно в 1.64; 1.79 и 2.5 раза по сравнению с ложнооперированными животными. В спинальных ганглиях животных группы “Боль + ПЭА” клетки-сателлиты располагаются в 1–2 слоя, характер взаимодействия их с нейронами после перевязки седалищного нерва практически не отличается от соответствующих показателей в группе “ЛО”. Количество клеток-сателлитов у животных, получающих ПЭА достоверно не отличается от ложнооперированных животных (рис. 2*д*, *е*).

Кроме того, травма периферического нерва сопровождается изменением площади распределения клеток сателлитов спинальных ганглиев. Наиболее значительные изменения регистрируются в группе “Боль”, плотность распределения GFAP-позитивных клеток в спинномозговых

ганглиях увеличивается в 3.4 раза, по сравнению с группой ложнооперированных животных. В группе “Боль + ПЭА” процент площади GFAP-позитивных клеток достоверно не отличается от группы “ЛО” (рис. 2 а, б).

Изменение активности селективного маркера микроглии/макрофагов (Iba-1), вызванное повреждением периферического нерва, было выявлено в спинальных ганглиях животных всех исследуемых групп. У ложнооперированных животных микроглиальные/макрофагальные клетки встречаются редко – единичные элементы веретеновидной формы с 2–3 первичными отростками располагаются вблизи от перикарионов псевдоуниполярных (рис. 2а). Повреждение периферического нерва сопровождается увеличением популяции микроглии/макрофагов, наиболее выраженное у животных группы “Боль” в ганглиях испилатеральной стороны. Количественная оценка иммуногистохимической активности микроглиального/макрофагального маркера в спинальных ганглиях животных группы “Боль” демонстрирует значительное увеличение площади окрашивания (в 4.6 раз по сравнению с группой “ЛО”). В группе “Боль + ПЭА” активация микроглии/макрофагов также наблюдается, хотя и имеет не столь выраженный характер. В данной группе площадь окрашивания Iba-1-позитивной микроглии/макрофагов спинальных ганглиев увеличивается в 1,92 раза по сравнению с ложнооперированными животными (рис. 2в).

Поверхностные пластины задних рогов спинного мозга. Активность GFAP-позитивных астроцитов существенно возрастает в поверхностных пластинках задних рогов спинного мозга и имеет наибольшую плотность в группе “Боль”, применение препарата ПЭА способствует снижению плотности распределения астроцитов более чем в 2 раза (“ЛО” – 4.2%, “Боль” – 19.1%, “Боль + ПЭА” – 8.75%) (рис. 3а, б).

В поверхностных пластинках задних рогов спинного мозга после перевязки седалищного нерва наблюдается увеличение площади окрашивания Iba1-позитивной микроглии. Это состояние регистрируется вплоть до 14-х суток после операции и в целом соответствует уровню болевой реакции по тестируемым параметрам. В случае ложнооперированных животных, иммунопозитивные клетки встречались относительно редко как в передних, так и в задних рогах спинного и представляли собой единичные веретенообразные элементы с 2–3 первичными отростками, расположенными вблизи нейрональной сомы. Активация микроглии характеризуется специфическим изменением морфологии – ретракция отростков и гипертрофия клеточных тел, а также приобретением амёбовидной формы, допускающей миграцию клеток к очагу воспаления (рис. 3а). Количественная оценка маркера микроглии в задних рогах спинного мозга животных в группе “Боль” показала значительное увеличение площади

окрашивания (в более чем 4 раза по сравнению с группой “ЛО”). Увеличение площади окрашивания Iba-1-позитивной микроглии также наблюдалось в задних рогах спинного мозга крыс в группе “Боль + ПЭА”, но была значительно менее выражена (в 2 раза по сравнению с группой “ЛО”) (рис. 3в).

Пальмитоилэтаноламид способствует снижению экспрессии nNOS на уровне первых двух звеньев ноцицептивных проводящих путей

На препаратах спинальных ганглиев ложнооперированных животных количество nNOS-позитивных нейронов составляет лишь малую долю от общей популяции клеток. При развитии нейропатической боли наблюдается увеличение количества иммунореактивных нейронов всех размеров. Количество nNOS-позитивных нейронов в группе “Боль” увеличивается в 3.4 раза по сравнению с группой ложнооперированных животных. В группе “Боль + ПЭА” отсутствуют достоверные отличия количества nNOS-позитивных нейронов от группы “ЛО” (рис. 2 а, з).

Кроме того, результаты иммуногистохимического исследования показывают более высокую продукцию оксида азота в задних рогах спинного мозга травмированных крыс (“Боль” – 5086.6 клеток/мм³) по сравнению с ложнооперированной группой животных (“ЛО” – 4060.1 клеток/мм³), а также достоверное снижение экспрессии nNOS-позитивных нейронов в группе “Боль + ПЭА” (4234.6 клеток/мм³) до уровня группы “ЛО” (рис. 3а, з).

Противовоспалительная активность пальмитоилэтаноламида в культуре клеток микроглии

Для оценки влияния ПЭА на уровень фермента его деградации (ASAHL/NAAA) были использованы средние значения каждой группы, предварительно нормализованные по β-актину. Методом вестерн-блоттинга было выявлено, что добавление ПЭА в концентрации 10 мкМ в клеточную среду к микроглии сопровождается двукратным увеличением синтеза фермента ASAHL (рис. 4а).

Результаты вестерн-блоттинга культуры клеток микроглии также демонстрируют прямую зависимость между экспрессией IL10 и увеличением концентрации ПЭА в среде. Максимальная количество белка в данном случае соответствует максимальной концентрации ПЭА – 10 мкМ. Аналогичная динамика прослеживается также для маркера маннозных рецепторов (CD206), которые экспрессируются преимущественно на противовоспалительных макрофагах (рис. 4б).

Результаты иммуноферментного анализа культуры клеток микроглии демонстрируют повышение уровней провоспалительных маркеров: TNFα, CD86 и МНС II при действии ЛПС (1 мкг/мл) на 15–20% по сравнению с контролем, и их сниже-

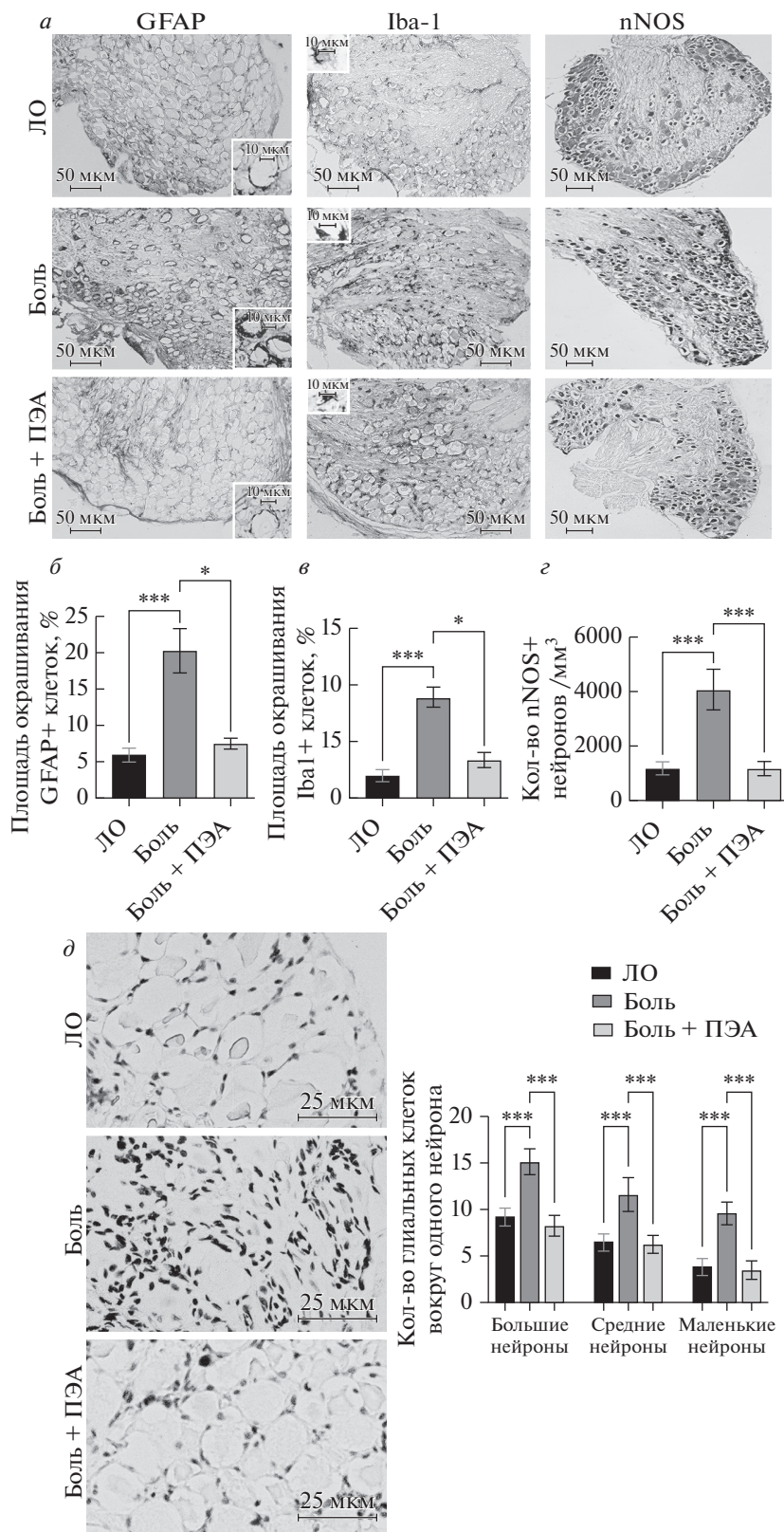


Рис. 2. Морфо-химические изменения в спинномозговых ганглиях при развитии болевой реакции и действии ПЭА. *а* – иммунопероксидазная реакция в ганглиях на маркер сателлитной глии (GFAP), микроглии/макрофагов (Iba-1) и нейрональную форму NO-синтазы (nNOS). Площадь иммунопозитивного окрашивания GFAP (*б*), Iba-1 (*в*), и количества nNOS-позитивных нейронов (*г*). Характеристика нейро-глиального индекса для нейронов разного калибра (*д*, *е*). Данные представлены как среднее значение ± SEM, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

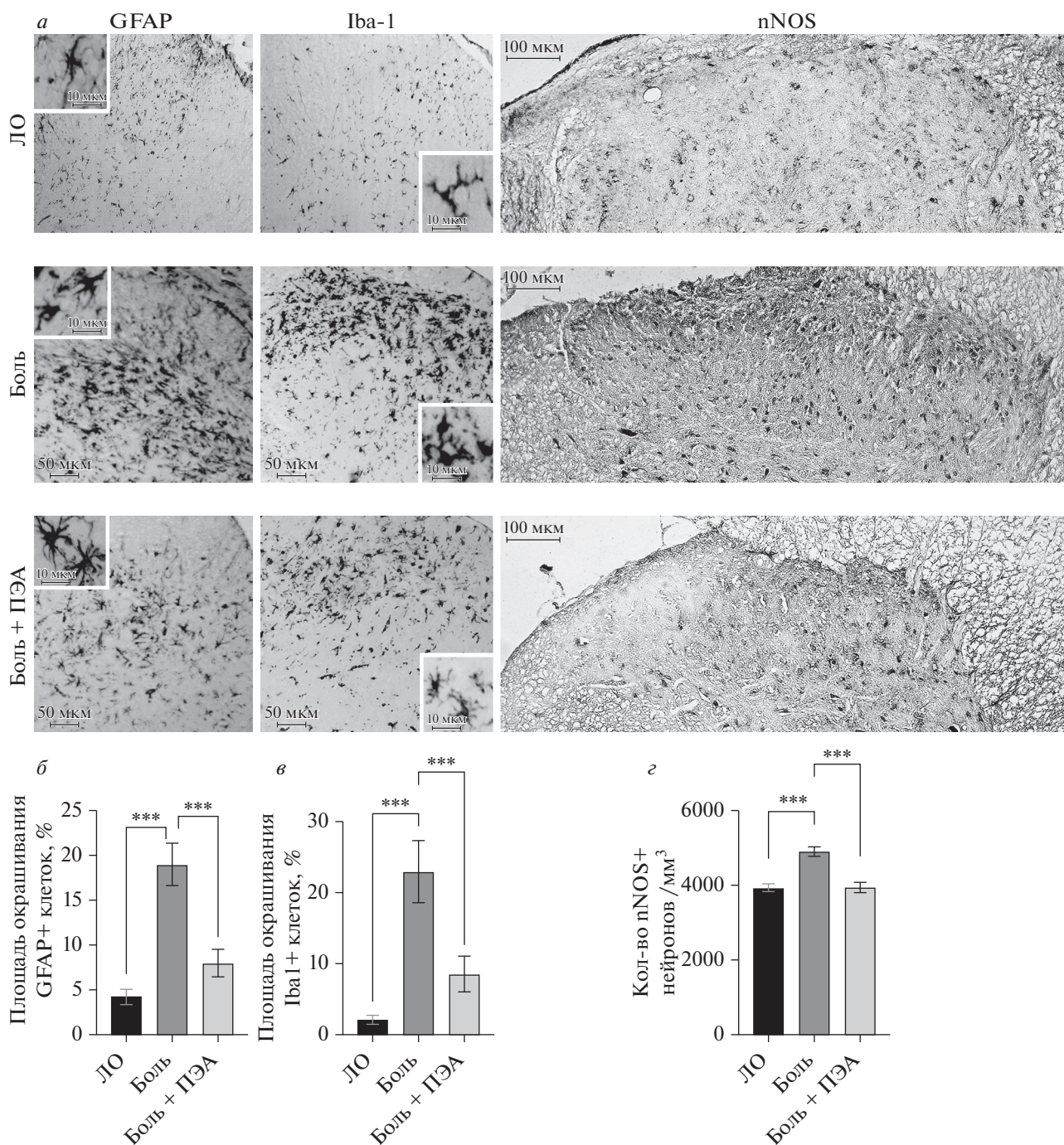


Рис. 3. Морфо-химические изменения в задних рогах спинного мозга при развитии болевой реакции и действии ПЭА. *а* – иммунопероксидазная реакция в поверхностных пластинах спинного мозга на маркер астроглии (GFAP), микроглии (Iba-1) и нейрональную форму NO-синтазы (nNOS). Площадь иммунопозитивного окрашивания GFAP (*б*), Iba-1 (*в*), и количества nNOS-позитивных нейронов (*г*). Данные представлены как среднее значение ± SEM, *** $p < 0.001$.

ние до контрольных значений при применении ПЭА (рис. 4*в–д*).

ОБСУЖДЕНИЕ

Перевязка седалищного нерва ведет к развитию нейропатического болевого синдрома, активность

которого может быть количественно охарактеризована с помощью инструментальных тестов. При развитии нейропатической боли порог температурной болевой чувствительности снижается уже в первые сутки и сохраняется на данном уровне вплоть до конца эксперимента. Несимметричное использование задних конечностей в удержании

веса также было выражено с первых суток, и вплоть до конца наблюдения не возвращалось к уровню интактного контроля. Используемые в исследовании тесты болевого поведения считаются характеристикой, собственно, ноцицептивных систем (тест холодной и горячей пластины), а также отражают глубину моторной дисфункции (тест инвалидности), поскольку поврежденный седалищный нерв содержит не только сенсорные, но и двигательные волокна [16]. Результаты тестирования животных, получающих препарат ПЭА свидетельствуют о наличии анальгетического действия, проявляющегося как снижением интенсивности ноцицептивных реакций в ответ на температурный стимул, так и меньшей степенью моторной дисфункции, поэтому последующую оценку клеточной активности методом иммуногистохимии проводили на уровне первых двух звеньев ноцицептивных проводящих путей (задние рога спинного мозга и спинномозговые ганглии).

Развитие нейропатического болевого синдрома приводит к динамическому и согласованному с выраженностью болевого поведения изменению количества nNOS-позитивных нейронов первичных переключаемых станций (спинномозговых ганглиев и задних рогов спинного мозга). Это явление неоднократно описано в литературе на различных экспериментальных моделях [17], и наши данные в целом соответствуют существующим экспериментальным и клиническим наблюдениям. Динамика NO-ергической активности в спинальных центрах боли протекает параллельно с активацией глии в данных структурах мозга. Локальная глиальная активность обеспечивает развитие процесса нейровоспаления, поддерживающего трансмиссию болевого сигнала [18]. В настоящем исследовании, увеличение площади окрашивания микро- и астроглии при развитии нейропатической боли характеризуется специфическим изменением морфологии (ретракция отростков и гипертрофия клеточных тел), также клетки приобретают амебовидную форму, которая позволяет им мигрировать к очагу воспаления. Кроме того, в спинномозговых ганглиях у животных группы "Боль" изменение нейро-глиального индекса присутствует у нейронов всех размерных групп и происходит как за счет увеличения количества клеток-сателлитов, так и увеличения их слоев вокруг крупных и средних нейронов. Предполагается, что прирост популяции клеток-сателлитов возникает не только вследствие их пролиферации, но и за счет клеток-сателлитов соседних погибших нейронов [19]. В этой связи нельзя исключать прямых взаимомодулирующих влияний спинальной глии и NO-ергических ноцицептивных нейронов; вероятно, что выраженность активации микро- и астроглии определяется эффективностью NO-ергической нейротрансмиссии. Так, при использовании различных анальгетических препаратов, направленных на снижение термической и механической аллодинии, вызванной нейропатической болью, показано, что наряду с уменьшением выраженности

поведенческих проявлений болевого синдрома наблюдается синхронное уменьшение уровня экспрессии нейрональной и индуцибельной NO-синтазы и снижение активации глии в спинальных ганглиях и задних рогах спинного мозга [20–23]. Кроме того, Meller с коллегами [24] доказали взаимосвязь между усилением продукции оксид азота и увеличением концентрации провоспалительных молекул в месте повреждения. Введение либо интерлейкина IL1 β и TNF α , либо эндотоксина (ЛПС) индуцировало экспрессию NO-синтазы в резидентных клетках ЦНС *in vitro*. А использование избирательных ингибиторов NO-синтазы *in vivo*, приводит к снижению гипералгезии. Также инъекция провоспалительных цитокинов индуцировала воспалительный ответ в спинном мозге, что способствовало усилению регуляции NO-синтазы в экзогенных воспалительных клетках [25].

В настоящем исследовании выраженность нейровоспалительного процесса и NO-ергической нейротрансмиссии, как показывают результаты морфометрического анализа, достоверно снижается в спинном мозге и спинальных ганглиях животных, получающих ПЭА. Пальмитоилэтаноламид является агонистом рецептора, активируемого пролифератором пероксисом-альфа (PPAR- α), который является фактором транскрипции в суперсемействе ядерных рецепторов. Активация PPAR- α приводит к изменению транскрипции большого количества генов, начиная от тех, которые кодируют белки, участвующие в транспорте и метаболизме жирных кислот, и заканчивая теми, которые кодируют провоспалительные молекулы и окислительный стресс [26]. Противовоспалительные эффекты агонистов PPAR- α включают транскрипцию провоспалительных факторов транскрипции, таких как NF κ B, что приводит к ингибированию высвобождения провоспалительных цитокинов (TNF α , IL1 β и IL6) [27]. Более того, полученные нами данные в экспериментах *in vivo* подтверждаются результатами как вестерн-блоттинга, так и иммуноферментного анализа культуры клеток микроглии. Добавление ПЭА приводит к ингибированию ЛПС-индуцированной выработки провоспалительных молекул: TNF α , MHC II и маркера клеточной поверхности провоспалительной микроглии CD86, а также индуцирует усиление экспрессии противовоспалительных молекул: IL10 и маркера противовоспалительной микроглии CD206, что на физиологическом уровне влечет за собой снижение интенсивности воспаления и, следовательно, интенсивности болевого синдрома. Фермент NAAA/ASAH1, идентифицированный относительно недавно и способный гидролизовать ПЭА более эффективно, чем анандамид и другие N-ацетилэтаноламиды [28] экспрессируется главным образом макрофагами и, как предполагается, в этих же клетках происходит его разрушение [29]. Тот факт, что обработка микроглиальных клеток препаратом ПЭА сопровождается увеличением активности ASAH1, подтверждает его метаболизм данным типом клеток в используемой фор-

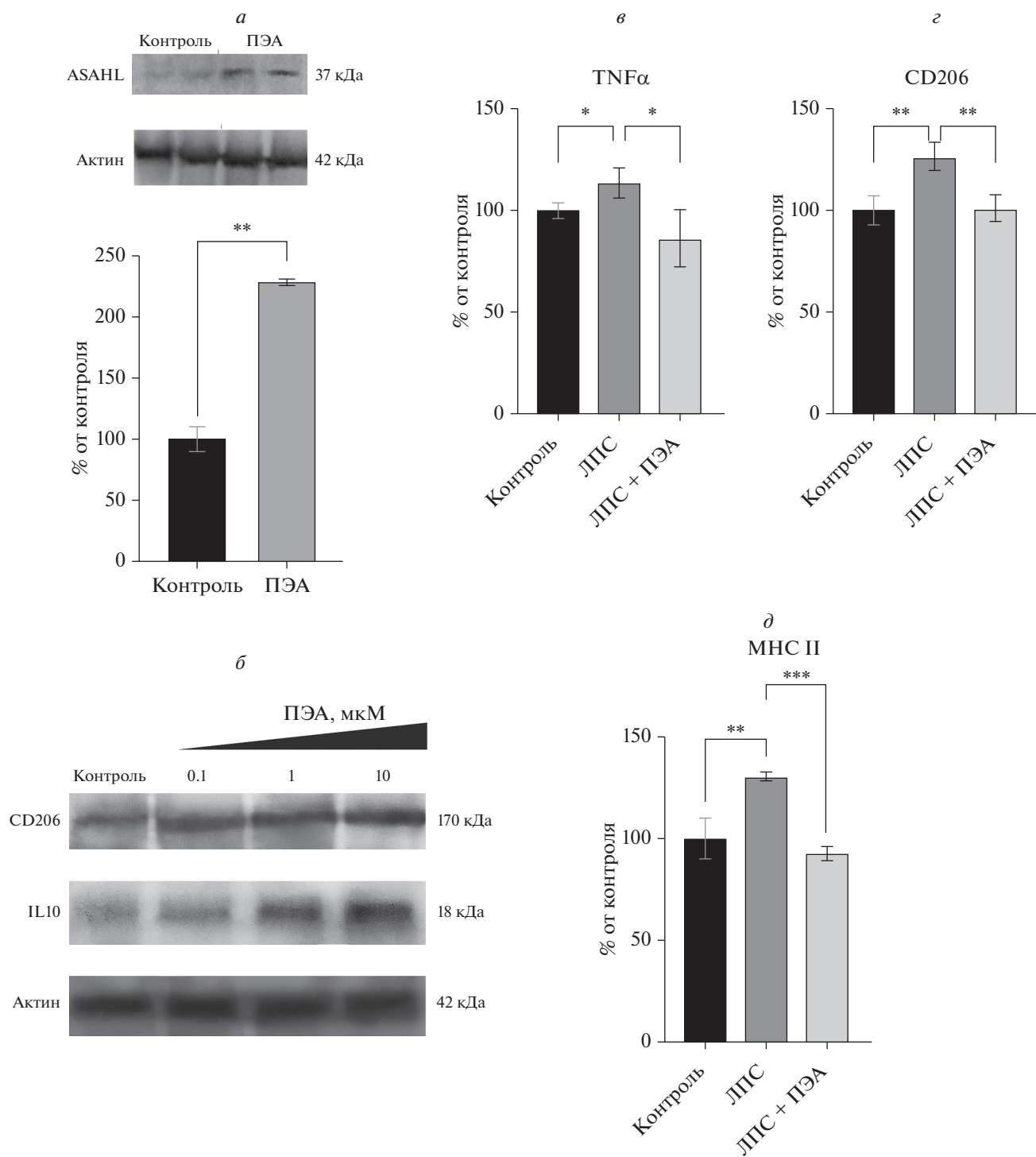


Рис. 4. (а) Вестерн-блоттинг культуры клеток микроглии на фермент ASAHL при добавлении ПЭА (10 мкМ). (б) Вестерн-блоттинг культуры клеток микроглии на противовоспалительные маркеры (CD206, IL10) при добавлении ПЭА в возрастающей концентрации (0.1, 1, 10 мкМ). Иммуноферментный анализ культуры клеток микроглии на TNFα (в), CD86 (г), MHC II (д), при ЛПС-индуцированном и добавлении ПЭА (10 мкМ). Данные представлены как среднее значение ± SEM, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.001$.

ме, и косвенно подтверждает гипотезу, что экзогенный ПЭА способен метаболизироваться глияльными клетками, находящимися как на уровне ганглиев, так и на уровне спинного мозга.

Таким образом, результаты физиологического тестирования, последующее иммуногистохимические исследования и параллельный анализ культуры микроглиальных клеток не противоре-

чат друг другу и указывают на возможность ПЭА к реализации анальгетического действия за счет глиального, и нейронального компонента как на уровне периферической (спинномозговые ганглии), так и на уровне центральной (спинной мозг) нервной системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berker A.B., Beyer C., Zulloff-Shani A., Brener E., Bloch M.H. // *Pain Physician*. 2017. V. 20. P. 353–362.
2. Amor S., Woodroffe N. // *Immunology*. 2014. V. 141. P. 287–291.
3. Muthuraju S., Karuppan Z.R., Al-Rahbi B. // *BioMed Research Int*. 2020. V. 2020. 9231452.
4. Subhramanyam C.S., Wang C., Hu Q., Dheen S.T. // *Semin Cell Dev Biol*. 2019. V. 94. P. 112–120.
5. Watson J.C., Sandroni P. // *Mayo Clinic proceedings*. 2016. V. 91. P. 372–385.
6. Matta S.M., Hill-Yardin E.L., Crack P.J. // *Brain Behav. Immun*. 2019. V. 79. P. 75–90.
7. Leonard P.A., O'Donnell J., Wilson K. // *Emerg Med J*. 2001. V. 18. P. 316.
8. Obata K., Sato J., Funakubo M., Mizumura K. // *International Journal of Biometeorology*. 2010. V. 55. P. 319–326.
9. Schetters S.T.T., Vallejo D.J.J., Van Kooyk Y. // *Front. Immunol*. 2018. V. 8. P. 1905.
10. Chung M.K., Campbell J.N. // *Pharmaceuticals (Basel)*. 2016. V. 9. P. 66.
11. Bronzuoli M.R., Facchinetti R., Steardo L., Romano A., Stecca C., Passarella S., Steardo L., Cassano T., Scuderi C. // *Oxid Med Cell Longev*. 2018. V. 2018. 4720532.
12. Beggiano S., Tomasini M.C., Ferraro L. // *Front Pharmacol*. 2019. V. 10. P. 821.
13. Mattace R.G., Russo R., Calignano A., Meli R. // *Pharmacol Res*. 2014. V. 86. P. 32–41.
14. Petrosino S., Di Marzo V. // *Br J Pharmacol*. 2017. V. 174. P. 1349–1365.
15. Petrosino S., Puigdemont A., Della Valle M.F., Fusco M., Verde R., Allarà M., Aveta T., Orlando P., Di Marzo V. // *Vet J*. 2016. V. 207. P. 85–91.
16. Jasmin L., Kohan L., Franssen M., Janni G., Goff J.R. // *Pain*. 1998. V. 75. P. 367–82.
17. Costigan M., Scholz J., Woolf C.J. // *Annu Rev Neurosci*. 2009. V. 32. P. 1–32.
18. Mika J., Osikowicz M., Rojewska E. // *Eur. J. Pharm*. 2009. V. 623. P. 65–72.
19. Поёмбак А.И. // Санкт-Петербург: Наука. 1993. – 352 с.
20. Kuboyama K., Tsuda M., Tsutsui M., Toyohara Y., Tozaki-Saitoh H., Shimokawa H., Yanagihara N., Inoue K. // *Mol Pain*. 2011. V. 7. P. 50.
21. Arakawa Y., Qin J., Chou H., Bhatt S., Wang L., Stuehr D., Ghosh A., Fung J.J., Lu L., Qian S. // *Transplantation*. 2014. V. 97. P. 740–747.
22. Liu C.P., Dai Z.K., Huang C.H., Yeh J.L., Wu B.N., Wu J.R., Chen I.J. // *Kaohsiung J Med Sci*. 2014. V. 6. P. 267–78.
23. Liu X., Wang D., Zhao R., Dong X., Hu Y., Liu P. // *Front Pharmacol*. 2016. V. 7. P. 337.
24. Meller S.T., Cummings C.P., Traub R.J., Gebhart G.F. // *Neuroscience*. 1994. V. 60. P. 367–374.
25. Rothwell N.J., Hopkins S.J. // *Trends Neurosci*. 1995. V. 3. P. 130–136.
26. Bougarne N., Weyers B., Desmet S.J., Deckers J., Ray D.W., Staels B., De Bosscher K. // *Endocr Rev*. 2018. V. 39. P. 760–802.
27. Wójtowicz S., Strosznajder A.K., Jeżyna M., Strosznajder J.B. // *Neurochem Res*. 2020. V. 45. P. 972–988.
28. Tsuboi K., Sun Y.X., Okamoto Y., Araki N., Tonai T., Ueda N. // *J Biol Chem*. 2005. V. 280. P. 11082–11092.
29. Sun Y.X., Tsuboi K., Zhao L.Y., Okamoto Y., Lambert D.M., Ueda N. // *Biochim Biophys Acta*. 2005. V. 1736. P. 211–220.

Analgesic Activity of Palmitoylethanolamide on Neuropathic Pain in Rats

D. N. Ivashkevich^a, I. V. Manzhulo^a, A. I. Ponomarenko^a, A. A. Tyrtysnaia^a, and I. V. Dyuzen^a

^a A.V. Zhirmunsky National Scientific Center of Marine Biology, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russia

The analgesic activity of palmitoylethanolamide (PEA, C₁₈H₃₇NO₂) was studied in a model of rat sciatic nerve damage. We used a complex of physiological, biochemical and immunohistochemical methods for detecting the activity of micro-, astroglia, and the nNOS-positive neurons. It was found that PEA injection (100 mg/kg) decreased the intensity and duration of neurogenic pain syndrome and resulted in earlier stabilization of weight distribution. Oral treatment of PEA stabilizes the level of activity of micro-, astroglia and nNOS-positive neurons in the spinal cord dorsal horn and spinal ganglia. In addition, in microglial cell culture (SIM-A9) PEA inhibits the production of LPS-induced pro-inflammatory cytokines (TNFα), marker of a major histocompatibility complex (MHC II) and a cell surface marker of pro-inflammatory microglia (CD86), as well as leads to increase of anti-inflammatory interleukin-10 (IL10) production and a cell-surface anti-inflammatory microglia marker (CD206). The results of this study document the complex effect of PEA on the neuroinflammation process, which is probably explored by its analgesic potential.

Keywords: neuropathic pain, spinal cord, spinal ganglia, palmitoylethanolamide, PEA, astroglia, microglia, nNOS, cytokines

СОПРЯЖЕННОСТЬ НЕКОТОРЫХ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ С РАСПРЕДЕЛЕНИЕМ УРОВНЯ ПОСТОЯННОГО ПОТЕНЦИАЛА ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ НЕЙРОСЕНСОРНОЙ ТУГОУХОСТИ

© 2022 г. Г. М. Бодиенкова¹, *, О. Л. Лахман¹, Е. В. Боклаженко¹, О. И. Шевченко¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
“Восточно-Сибирский институт медико-экологических исследований”, Ангарск, Россия

Поступила в редакцию 28.12.2021 г.

После доработки 20.01.2022 г.

Принята к публикации 29.03.2022 г.

Цель исследования заключалась в выявлении взаимосвязи между изменением некоторых показателей иммунной системы (цитокины, нейрональные антитела) и распределением уровней постоянного потенциала (УПП) головного мозга у пациентов с профессиональной нейросенсорной тугоухостью (НСТ). Проведено обследование 55 мужчин с профессиональной НСТ, сформировавшейся при воздействии авиационного шума и 34 – “условно” здоровых мужчин, сопоставимых по возрасту. В результате корреляционного анализа установлено, что чем выше концентрации провоспалительного IL-1 β , который первым включается в ответную реакцию организма, регулируя неспецифический и специфический иммунный ответ, тем выше УПП межполушарной лобной асимметрии энергетического обмена (Fd-Fs). Напротив, нарастание концентрации TNF- α сопровождалось снижением УПП в левом лобном отведении (Fs). Полученные результаты могут свидетельствовать о важной роли IL-1 β и TNF- α в регуляции процессов межполушарной деятельности при гиперполяризации мембран нейронов в лобных отделах головного мозга, активации в лобных отделах головного мозга, а также подтверждают, что цитокиновая регуляция иммунного ответа происходит на уровне целостного организма. Также показано рассогласование значительного количества взаимосвязей и появление новых отрицательных зависимостей между уровнями антител (АТ) к белкам: В-зав. Са-канал, Хол-Р, Сер-Р и УПП в правой и левой теменной областях (Pd, Ps), АТ к ГАМК-Р, Глу-Р и УПП в левой теменной области (Ps), АТ к Глу-Р с показателями межполушарной лобной асимметрии УПП (Fd-Fs), что свидетельствует о важной роли нейроаутоиммунных реакций в развитии нарушений энергетического обмена мозга. Характеристики УПП, коррелирующие с иммунохимическими показателями, отражают не только нейрофизиологические механизмы, но и характеризуют функциональное состояние адаптивных систем организма в целом. В дальнейшем это может использоваться для практической разработки новых методов диагностики различных состояний.

Ключевые слова: нейросенсорная тугоухость, цитокины, антитела к нервной ткани, диагностика

DOI: 10.31857/S1027813322330019

ВВЕДЕНИЕ

Нейросенсорная тугоухость во всем мире относится к широко распространенным заболеваниям и обусловлена многообразием неблагоприятных факторов, приводящих к тугоухости и глухоте, в том числе профессиональных. Выраженной тугоухостью страдает 1–6% населения земного шара [1]. Вместе с тем в современный период проблема диагностики и лечения заболевания не теряет своей актуальности. Это связано с тем, что НСТ характеризуется полиморфностью клинической картины, а изменения в нервной системе, как правило, сочетаются с поражением иммунной, сердечно-сосудистой, пищеварительной, эндокринной систем. При

развитии приобретённой НСТ выделяют ряд последовательных стадий: ишемия, расстройства кровообращения, гибель чувствительных клеток внутреннего уха и нервных элементов проводящего пути слухового анализатора. Известно, что эффективность работы мозговых структур во многом связана с процессами энергетического обеспечения головного мозга [2]. Для оценки энергетического обмена мозга в современных электрофизиологических лабораториях преимущественно выделяют нейроэнергокартирование – регистрация уровня постоянного потенциала (УПП) головного мозга с последующей компьютерной обработкой [3]. Характеристики УПП головного мозга можно расценивать как интегральные показатели энергетического состояния головного мозга, которые отражают состояние кислотно-щелочного равновесия в мозге, а также связаны с изменением иммунологи-

* Адресат для корреспонденции: 665827 Россия, Иркутская область, Ангарск, 12а м-н, д. 3, а/я 1170; тел.: +7(3955)58-69-10 (доб. 1411); e-mail: immun11@yandex.ru.

ческих и биохимических параметров, характеризующих состояние адаптационных систем организма в целом. Учитывая современные научные исследования, показывающие, что исследование УПП головного мозга способствует раскрытию механизмов взаимообусловленности энергетического метаболизма головного мозга и других систем организма [4], актуальным является выявление зависимости между показателями, характеризующими состояние нейроэнергообмена и изменением нейроаутоиммунных реакций. НСТ относится к проблемным заболеваниям в плане диагностики и лечения. В основе ее развития лежит нарушение чувствительных нервных волокон внутреннего уха, слухового нерва и центральных образований слуховой системы. Вместе с тем, в свете современных представлений важную роль в механизмах развития и течения НСТ играет нейроиммунноэндокринная регуляция. Благодаря взаимоотношениям нервной и иммунной систем, патология последних приобретает свои особенности, обусловленные не только прямым воздействием патогенного агента на ту или иную систему, но и опосредованно через изменения другой интегративной системы. Кроме того, течение НСТ довольно часто сочетается с общесоматической патологией [5], в том числе с сердечно-сосудистой, что создает дополнительные сложности в ее выявлении и диктует необходимость создания и совершенствования, новых патогенетически обоснованных подходов к разработке иммунохимических маркеров и оценки их диагностической значимости.

Цель исследования — выявить взаимосвязь между изменением некоторых показателей иммунной системы (цитокинов, нейрональных антител) и распределением уровня постоянного потенциала головного мозга у пациентов с профессиональной нейросенсорной тугоухостью.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование были включены 55 мужчин с установленным диагнозом профессиональной НСТ, сформировавшейся при воздействии авиационного шума (персонал летного состава), которые находились на обследовании и лечении в клинике института. Средний возраст обследованных пациентов составил 52.0 ± 1.36 г. Клиническая верификация диагнозов осуществлялась врачами клиники в соответствии с Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (МКБ-10). Группа сравнения представлена 34 “условно” здоровыми лицами, которые по специфике профессиональной деятельности не подвергались хроническому воздействию шума (средний возраст — 50.35 ± 1.69 лет).

Кровь для исследования у пациентов брали однократно при поступлении в стационар, натощак до проведения лечения, используя пробирки Vacutainer, которые центрифугировали при 1500 г в течение 15 минут для получения сыворотки.

Сыворотку отбирали в отдельные пробирки Эппендорф (Eppendorf). Содержание цитокинов (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, TNF- α , INF- γ) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием тест-систем производства “Вектор-Бест” (г. Новосибирск). С помощью стандартных тест-систем ЭЛИ-Нейро-Тест (МИЦ “Иммункулус” г. Москва) оценивали сывороточные концентрации АТ класса IgG к антигенам нервной ткани: нейрофиламентному протеину-200 (NF-200), глиальному фибриллярному кислому белку (GFAP), S-100, основному белку миеллина (ОБМ), вольтажзависимому Са-каналу (В-зав. Са-канал), глутаматным рецепторам (Глу-Р), дофаминовым рецепторам (ДА-Р), ГАМК — рецепторам (ГАМК-Р), серотониновым рецепторам (Сер-Р), холинорецепторам (Хол-Р), ДНК, β 2 гликопротеину (Б2ГП).

Регистрацию УПП головного мозга осуществляли с помощью электрофизиологического метода нейроэнергокартирования (НЭК) — программируемого усилителя биологических потенциалов милливольтного диапазона. УПП головного мозга возникает в результате суммации мембранных потенциалов нервных и глиальных клеток, а также разности потенциалов на мембранах гематоэнцефалического барьера. Этот метод предполагает биохимическую нейровизуализацию и оценку интенсивности церебрального энергетического метаболизма головного мозга с помощью неинвазивной регистрации и анализа сдвига УПП. По степени выраженности изменений энергетического обмена головного мозга определяли уровень интенсивности нейрометаболизма. Исследования проводили на аппаратно-программном комплексе для топографического картирования электрической активности “Нейро-КМ” (г. Москва). Анализ данных выполняли путем картирования полученных значений, зарегистрированных по всем областям головы с помощью неполярных хлорсеребряных электродов. Референтный электрод располагали на запястье правой руки, а активные электроды — в 12 отведениях по международной системе “10–20%”: Fz, Fd, Fs (лобных); Pz, Pd, Ps (теменных); Ts, Td (височных) и Oz (затылочном), Cz, Cs, Cd (центральных).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета прикладных программ “STATISTICA 6.0” (StatSoft, USA). Возраст и стаж работы обследованных пациентов представлены в виде средней (M) и ее ошибки (m). Проверку нормальности распределения выполняли с использованием критерия Шапиро—Уилкса. Результаты 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 $p < 0.05$. Обследование пациентов проходило в соответствии с этическим стандартом Хельсинской декларации всемирной ассоциации “Этические принципы

проведения научных медицинских исследований с участием человека”, с поправками 2000г. и “Правилами клинической практики в Российской Федерации”, утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003г., с информированного согласия пациентов и по заключению местного этического комитета (протокол № 5 от 14.11.2012).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты предыдущего исследования по выявлению особенностей энергетического обмена головного мозга у пациентов с НСТ свидетельствовали об изменении УПП в лобных, центральных, левом теменном, правом височном отведениях относительно группы сравнения. Анализ распределения показателей УПП всех отделов головного мозга показал неравномерность их профиля, что характеризует нарушение принципа “куполообразности” у обследованных пациентов. Установленный факт могут свидетельствовать о функциональном напряжении головного мозга с преимущественной дисфункцией его диэнцефальных отделов [6]. Известно, что длительное сохранение измененного нейрометаболизма и нейроэнергетики при продолжающемся воздействии стрессирующих производственных факторов способствует развитию многообразных нарушений в организме, в том числе функциональных расстройств ЦНС, возникновению атрофических изменений в гиппокампе. Параллельно у этих же лиц выявлен дисбаланс в иммунной системе. У большинства пациентов наблюдалась гиперпродукция провоспалительных цитокинов: IL-1 β и TNF- α и противовоспалительного IL-4 на фоне снижения IL-2. Установлено и усиление аутоиммунных реакций относительно значительного количества нейрональных АТ [7]. Принципиально важным для понимания и практического использования результатов иммунохимического исследования и показателей энергетического обмена головного мозга является диагностическая и прогностическая ценность. Поэтому на следующем этапе исследований представляло определенный интерес выявить взаимосвязь между показателями иммунной системы и интенсивностью нейроэнергообмена. Тем более что в настоящее время имеются единичные сообщения о том, что УПП головного мозга отражает не только индивидуальные особенности общего и локального уровня энергетических затрат, связанных с функциональным состоянием мозга и нервной системы, но и опосредованно организма в целом [8].

Результаты корреляционного анализа между концентрациями цитокинов и УПП головного мозга представлены в табл. 1. При анализе данных, представленных в таблице, выявлена прямая статистически значимая взаимосвязь IL-1 β с УПП в отведениях Fd-Fs. То есть чем выше концентрация IL-1 β , тем выраженнее межполушарная асимметрия лобных отделов головного мозга. Важно отметить, что IL-1 β является основным

индуцибельным провоспалительным цитокином, обладающим широким спектром действия и первым включается в ответную реакцию организма, регулируя неспецифический и специфический иммунный ответ. Исследованиями показано, что усиление продукции IL-1 β может играть важную роль в дегенерации нейронов, увеличивая экспрессию MMP9 [9]. Обнаружена и отрицательная корреляционная зависимость между TNF- α и УПП левого лобного отведения (Fs). TNF- α является существенным компонентом иммунной системы, стимулирующим экспрессию генов, необходимых для контроля воспаления и повреждения тканей. Гиперпродукция этого цитокина лежит в основе хронизации иммунопатологического процесса. В настоящее время доказана роль TNF- α в патогенезе некоторых системных аутоиммунных демиелинизирующих заболеваний [10]. Кроме того, отдельными авторами обнаружено, что постепенное увеличение концентрации TNF- α в плазме крови было сопряжено с когнитивной дисфункцией. Повышение уровня этого цитокина также ассоциировалось с уменьшением объема серого вещества и увеличением гиперинтенсивности белого вещества головного мозга по результатам магнитно-резонансной томографии [11]. Следует отметить, что в группе сравнения, приведенные выше зависимости, не обнаружены. Однако показана прямая статистически значимая зависимость провоспалительного IL-8 и противовоспалительного IL-4 с УПП головного мозга в центрально-теменной области (Pz). А также прямая зависимость между концентрацией INF- γ и УПП в центральной и левой теменных (Pz, Ps), левой лобной (Fs) и затылочной (Oz) областях. Полученные результаты, вероятно, могут свидетельствовать о важной роли IL-1 β и TNF- α в регуляции процессов нейроэнергообмена в лобных отделах головного мозга в норме, а также подтверждают, что цитокиновая регуляция иммунного ответа происходит на уровне целостного организма, где цитокины осуществляют связь между иммунной, нервной и другими системами для их вовлечения в регуляцию единой защитной реакции [12]. Анализируя корреляционные взаимоотношения между уровнями АТ к белкам нервной ткани и УПП головного мозга (табл. 2), обращает на себя внимание большое количество взаимосвязей между показателями в группе сравнения (23 отрицательных и 8 положительных). У пациентов с НСТ происходит рассогласование значительного количества связей (остается 9 отрицательных и 2 положительных). Вместе с тем появляются новые отрицательные взаимосвязи между уровнями АТ к белкам: В-зав. Са-канал, Глу-Р, Хол-Р, ГАМК-Р, Сер-Р и УПП в левой теменной (Ps) области, В-зав. Са-канал, Хол-Р, Сер-Р и УПП в правой теменной области (Pd), Глу-Р с УПП в правой височной области (Td). Известно, что префронтальная кора (Fz, Fd, Fs) отвечает не только за планирование и контроль последовательности действий, но также и за поведенческое торможение, регуля-

Таблица 1. Корреляционные коэффициенты между цитокинами и УПП головного мозга у пациентов с НСТ и группы сравнения

УПП головного мозга в отведениях, мВ		IL-1 β , пг/мл	IL-4, пг/мл	IL-8, пг/мл	TNF- α , пг/мл	INF- γ , пг/мл
Fs	1	–	–	–	–0.313 <i>p</i> = 0.02	–
	2	–	–	–	–	0.540 <i>p</i> = 0.028
Oz	1	–	–	–	–	–
	2	–	–	–	–	0.530 <i>p</i> = 0.03
Pd	1	–	–	–	–	–
	2	–	–	–	–	–
Pz	1	–	–	–	–	–
	2	–	0.540 <i>p</i> = 0.036	0.690 <i>p</i> = 0.022	–	0.650 <i>p</i> = 0.018
Ps	1	–	–	–	–	–
	2	–	–	–	–	0.640 <i>p</i> = 0.015
Td	1	–	–	–	–	–
	2	–	–	–	–	–
Fd-Fs	1	0.336 <i>p</i> = 0.01	–	–	–	–
	2	–	–	–	–	–0.650 <i>p</i> = 0.03

Примечание: Знак “–” означает отсутствие статистически значимых связей между данными показателями при $p > 0.05$; 1 – пациенты с НСТ, 2 – группа сравнения.

цию эмоций и аффекта [3]. Важно отметить, что возрастание УПП, свидетельствующее об усилении метаболизма, ацидозе соответствует первой стадии стресса или мобилизации активационных процессов, а снижение УПП (алкалоз) соответствует третьей стадии стресса, торможению адаптационных механизмов, депрессии реактивности мозга [13]. Следует полагать, что чем быстрее пациент проходит от стадии активизации к стадии истощения, тем быстрее формируется патологический процесс. Учитывая, установленные зависимости, а также факт того, что у обследованных нами пациентов, течение НСТ сопровождается формированием мозговой дефицитарности, проявляющейся в виде функционального состояния нейронов соматосенсорной зоны коры головного мозга, таламических структур, когнитивной деятельности, есть все основания полагать о важной роли нейроаутоиммунных реакций в развитии нарушений функций мозга [14].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате корреляционного анализа между концентрациями цитокинов и УПП головного мозга у пациентов с НСТ установлено, что чем выше концентрации провоспалительного IL-1 β , который первым включается в ответную реакцию

организма, регулируя неспецифический и специфический иммунный ответ, тем выраженнее межполушарная лобная асимметрия (Fd-Fs). Нарастание концентрации TNF- α сопровождалось снижением УПП в левом лобном отведении (Fs). Полученные результаты могут свидетельствовать о важной роли IL-1 β и TNF- α в регуляции процессов активации в лобных отделах головного мозга, а также подтверждают, что цитокиновая регуляция иммунного ответа происходит на уровне целостного организма. Анализируя корреляционные взаимоотношения между уровнями АТ к белкам нервной ткани и УПП головного мозга, установлено рассогласование значительного количества взаимосвязей и появление новых отрицательных зависимостей между уровнями АТ к белкам: В-зав. Са-канал, Хол-Р, Сер-Р и УПП в правой и левой теменной (Pd, Ps) областях, ГАМК-Р, Глу-Р и УПП в левой теменной области (Ps), Глу-Р с УПП в височной области (Td), что подтверждает важную роль нейроаутоиммунных реакций в развитии нарушений нейроэнергообмена. Вместе с тем характеристики УПП, коррелирующие с иммунохимическими показателями, отражают не только нейрофизиологические механизмы, но и характеризуют функциональное состояние адаптивных систем организма в целом. В дальнейшем это может использоваться для

Таблица 2. Корреляционные коэффициенты между концентрациями нейрональных антител и УПП головного мозга у пациентов с НСТ и группы сравнения

УПП головного мозга в отведениях, мВ		Антитела к белкам, усл. ед.												
		S100	GFAP	ОБМ	NF-200	В-зав. Са кан.	Хол-Р	Глу-Р	ГАМК	Сер-Р	DA-R			
Fs	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-0.684 $p = 0.02$	-0.818 $p = 0.003$	-	-0.696 $p = 0.05$	-0.672 $p = 0.03$	-0.793 $p = 0.006$	-0.878 $p = 0.0008$	-0.644 $p = 0.04$	-	-	-	-	-
Oz	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-0.769 $p = 0.009$	-0.648 $p = 0.04$	-	-0.745 $p = 0.01$	-	-0.636 $p = 0.04$	-0.660 $p = 0.03$	-0.638 $p = 0.04$	-	-	-	-	-
Pd	1	-	-	-	-	-0.372 $p = 0.04$	0.327 $p = 0.02$	-	-	-	-0.296 $p = 0.02$	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pz	1	-	-	-	-	-	-0.270 $p = 0.04$	-	-	-	-	-	-	-
	2	-0.806 $p = 0.004$	-0.733 $p = 0.01$	-0.757 $p = 0.01$	-0.818 $p = 0.003$	-0.636 $p = 0.04$	-0.672 $p = 0.03$	-0.684 $p = 0.02$	-0.759 $p = 0.01$	-	-	-	-	-
Ps	1	-	-	-	-	-0.305 $p = 0.02$	-0.386 $p = 0.01$	-0.270 $p = 0.04$	-0.483 $p = 0.03$	-	-0.379 $p = 0.03$	-	-	-
	2	-0.745 $p = 0.01$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.660 $p = 0.03$	-	-
Td	1	-	-	-	-	-	-	-0.277 $p = 0.04$	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fd-Fs	1	-	-	0.471 $p = 0.04$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0.733 $p = 0.01$	0.866 $p = 0.001$	0.769 $p = 0.009$	0.903 $p = 0.0003$	0.818 $p = 0.003$	0.927 $p = 0.0001$	0.854 $p = 0.001$	0.784 $p = 0.007$	-	-	-	-	-

Примечание: Знак “-” означает отсутствие статистически значимых связей между данными показателями $p > 0.05$; 1 – пациенты с НСТ, 2 – группа сравнения.

практической разработки новых методов диагностики различных состояний.

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 РФ”, утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г.

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. Тарасова Н.В., Корженкова А.В. // Вестник медицинского института РЕАВИЗ. 2011. № 3. С. 20–26.
2. Khader P. Slow brain potentials reveal the neural dynamics of cognitive functions. <https://www.mendeley.com/profiles/patrick-khader/> (дата обращения 04.06.2015)
3. Фокин В.Ф., Пономарева И.В. // Энергетическая физиология мозга. М.: Антидор, 2003. 288 с.
4. Депутат И.С., Нехорошкова А.Н., Грибанов А.В., Большевицкая И.Л., Старцева Л.Ф. // Экология человека. 2015. № 10. С. 27–36.
5. Шешегов П.М., Зинкин В.Н., Сливина Л.П. // Авиакосмическая и экологическая медицина. 2018. Т. 52. № 3. С. 62–68.
6. Шевченко О.И., Русанова Д.В., Лахман О.Л. // Гигиена и санитария. 2019. Т. 98. № 10. С. 1068–1073.
7. G.M. Bodienkova, E.V. Boklazhenko // Neurochemical J. 2021. V. 15. № 1. P. 91–94.
8. Соколова Л.П. // Международный журнал экспериментального образования. 2011. № 6. С. 29.
9. Zhang Q., Adisheshaiah P., Reddy S.P. // Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 2005. V. 32. № 1. P. 72–81.
10. Kassiotis G., Kollias G. // J. Exp. Med. 2001. № 193. P. 427–434.
11. Lindbergh C.A., Casaletto K.B., Staffaroni A.M., Elahi F. // The J. Gerontology Series A Biological Sciences and Medical Sciences. 2019. V. 75(8). P. 1558–1565.
12. Созаева Д.И., Бережанская С.Б. // Кубанский научный медицинский вестник. 2014. № 3(145). С. 145–150.
13. Панков М.Н., Депутат И.С., Кожевникова И.С., Багрецова Т.В. // Научное обозрение. Биологические науки. 2018. № 5. С. 5–9. <https://science-biology.ru/ru/article/view?id=1116> (дата обращения: 07.06.2021).
14. Шевченко О.И., Лахман О.Л. // Экология человека. 2020. № 2. С. 18–23.

Conjugation of Certain Immunological Indices with Distribution of Level of Constant Brain Potential in Neurosensory Hearing Loss

G. M. Bodienkova^a, O. L. Lakhman^a, E. V. Boklazhenko^a, and O. I. Shevchenko^a

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

The aim of the study was to identify the relationship between the change in certain immune system indicators (cytokines, neuronal antibodies) and the distribution of level of constant brain potential (LCP) in patients with occupational neurosensory hearing loss (NHL). A survey was conducted of 55 men with professional NHL, formed under the influence of aviation noise and 34 – “conditionally” healthy men, comparable in age. As a result of correlation analysis, it was found that the higher the concentration of proinflammatory IL-1 β , which is the first to be included in the body’s response by regulating the nonspecific and specific immune response, the higher the LCP of the inter-hemisphere frontal asymmetry of energy metabolism (Fd–Fs). In contrast, the increase in TNF- α concentration was accompanied by a decrease in LCP in the left frontal branch (Fs). The results can indicate the important role of IL-1 β and TNF- α in the regulation of processes of interhemispheric activity in hyperpolarization of neuronal membranes in the frontal parts of the brain, activation in the frontal parts of the brain, and also confirm that cytokine regulation of the immune response occurs at the level of a holistic organism. The misalignment of a significant number of relationships and the appearance of new negative relationships between the levels of antibodies (AB) to proteins: V-dep Ca-channel, Chol-R, Ser-R and LCP in the right and left parietal regions (Pd, Ps), AB to GABA-R, Glu-R and LCP in the left parietal region (Ps), AB to Glu-R with indicators of inter-ear frontal asymmetry of LCP (Fd–Fs), which indicates an important role of neuroautoimmune reactions in the development of brain energy metabolism disorders. The characteristics of LCP, correlated with immunochemical indicators, reflect not only neurophysiological mechanisms, but also characterize the functional state of the adaptive systems of the body as a whole. In the future, this can be used to practically develop new methods for diagnosing various conditions.

Keywords: sensory hearing loss, cytokines, antibodies to nervous tissue, diagnostics