

# СОДЕРЖАНИЕ

Том 86, выпуск 6, 2021

**Специальный выпуск «Биохимия стресс-зависимых заболеваний мозга:  
фундаментальные и трансляционные аспекты»  
Ответственный редактор Н.В. Гуляева**

Роль изменений экспрессии HOMER1 в чувствительности к стрессу (обзор) <i>В.В. Решетников, Н.П. Бондарь</i>	755
Белок DJ-1 и его роль в развитии болезни Паркинсона: исследования на экспериментальных моделях (обзор) <i>О.А. Бунеева, А.Е. Медведев</i>	771
Ассоциированные со стрессом гиппокампальные молекулярно-клеточные механизмы, общие для эпилепсии и коморбидных депрессивных расстройств (обзор) <i>Н.В. Гуляева</i>	787
Изменение экспрессии генов и нейровоспаление в гиппокампе после фокальной ишемии мозга: участие в индукции длительных когнитивных и психоэмоциональных нарушений (обзор) <i>Г.Т. Шишкина, Т.С. Калинина, Н.В. Гуляева, Д.А. Ланшаков, Н.Н. Дыгало</i>	805
Митохондриальные нарушения при болезни Альцгеймера (обзор) <i>В.С. Сухоруков, Н.М. Муджири, А.С. Воронкова, Т.И. Баранич, В.В. Глинкина, С.Н. Иллариошкин</i>	816
Влияние глобальной ишемии головного мозга на метаболизм белка-предшественника $\beta$ -амилоида и экспрессию амилоид-деградирующих ферментов в коре головного мозга крыс: роль в патогенезе болезни Альцгеймера <i>Е. Бабусикова, Д. Доброта, Э.Дж. Тернер, Н.Н. Наливаева</i>	831
Неонатальный провоспалительный стресс и экспрессия генов, ассоциированных с нейровоспалением, в гиппокампе крыс <i>А.А. Квичанский, Л.В. Третьякова, М.Н. Волобуева, А.О. Манолова, М.Ю. Степаничев, М.В. Онуфриев, Ю.В. Моисеева, Н.А. Лазарева, А.П. Большаков, Н.В. Гуляева</i>	845
Длительная социальная изоляция приводит к снижению экспрессии предшественника BDNF и пролилэндопептидазы в структурах мозга крыс <i>С.Д. Ширенова, Н.Н. Хлебникова, Н.А. Крупина</i>	857
Пренатальный стресс при материнской гипергомоцистеинемии: нарушения развития нервной системы плода и функционального состояния плаценты (обзор) <i>А.В. Арутюнян, Г.О. Керкешко, Ю.П. Милютин, А.Д. Щербицкая, И.В. Залозная</i>	871
Сравнительный анализ патобиохимических нарушений при депрессии и посттравматическом стрессовом расстройстве (обзор) <i>К.Н. Ступин, М.Ю. Зенько, Е.А. Рыбникова</i>	885
Современные представления о роли стресса в патогенезе хронических нейродегенеративных заболеваний (обзор) <i>Л.Г. Хаспеков</i>	894
Действие неонатальных введений бактериального эндотоксина на поведение и экспрессию генов ионотропных рецепторов глутамата в гиппокампе взрослых крыс после психогенной травмы <i>В.А. Никитина, М.В. Захарова, А.Н. Трофимов, А.П. Шварц, Г.В. Безнин, С.Г. Цикунов, О.Е. Зубарева</i>	904
Повреждение гематоэнцефалического барьера при стрессе и нейродегенерации: биохимические механизмы и новые модели для трансляционных исследований (обзор) <i>А.Б. Салмина, Ю.К. Комлева, Н.А. Малиновская, А.В. Моргун, Е.А. Тепляшина, О.Л. Лопатина, Я.В. Горина, Е.В. Харитонова, Е.Д. Хилажеева, А.Н. Шуваев</i>	917
Моноаминоксидаза как потенциальный биологический маркер эффективности терапии психических заболеваний (обзор) <i>М.Г. Узбеков</i>	933

# CONTENTS

Vol. 86, Publ. 6, 2021

---

---

**Biochemistry of Stress-Related Brain Diseases: Fundamental and Translational Aspects (Special Issue)**  
**Guest Editor Natalia V. Gulyaeva**

The Role of Stress-Induced Changes in the Expression of HOMER1 in Stress Susceptibility (Review) <i>V. V. Reshetnikov and N. P. Bondar</i>	755
DJ-1 Protein and Its Role in the Development of Parkinson's disease: Studies on Experimental Models (Review) <i>O. A. Buneeva and A. E. Medvedev</i>	771
Stress-Associated Shared Molecular and Cellular Hippocampal Mechanisms of Epilepsy and Comorbid Depressive Disorders (Review) <i>N. V. Gulyaeva</i>	787
Changes in Gene Expression and Neuroinflammation in the Hippocampus after Focal Brain Ischemia: Participation in the Long-Term Cognitive and Psychological Disturbances (Review) <i>G. T. Shishkina, T. S. Kalinina, N. V. Gulyaeva, D. A. Lanshakov, and N. N. Dygalo</i>	805
Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease (Review) <i>V. S. Sukhorukov, N. M. Mudzhiri, A. S. Voronkova, T. I. Baranich, V. V. Glinkina, and S. N. Illarioshkin</i>	816
Effect of Global Brain Ischemia on Amyloid Precursor Protein Metabolism and Expression of Amyloid-Degrading Enzymes in Rat Cortex: Role in Pathogenesis of Alzheimer's Disease <i>E. Babusikova, D. Dobrota, A. J. Turner, and N. N. Nalivaeva</i>	831
Neonatal Proinflammatory Stress and Expression of Genes Associated with Neuroinflammation in the Hippocampus of Rats <i>A. A. Kvichansky, L. V. Tretyakova, M. N. Volobueva, A. O. Manolova, M. Yu. Stepanichev, M. V. Onufriev, Y. V. Moiseeva, N. A. Lazareva, A. P. Bolshakov, and N. V. Gulyaeva</i>	845
Long-Term Social Isolation Reduces BDNF Precursor and Prolyl Endopeptidase Expression in Rat Brain Structures <i>S. D. Shirenova, N. N. Khlebnikova, and N. A. Krupina</i>	857
Prenatal Stress in Maternal Hyperhomocysteinemia: Disorders of the Development of the Fetal Nervous System and the Functional State of the Placenta (Review) <i>A. V. Arutjunyan, G. O. Kerkeshko, Y. P. Milyutina, A. D. Shcherbitskaia, and I. V. Zalozniaia</i>	871
Comparative Analysis of Pathobiochemical Changes in Major Depression and Post-Traumatic Stress Disorder (Review) <i>K. N. Stupin, M. Y. Zenko, and E. A. Rybnikova</i>	885
Current Views on the Role of Stress in the Pathogenesis of Chronic Neurodegenerative Diseases (Review) <i>L. G. Khaspekov</i>	894
Neonatal Exposure to Bacterial Lipopolysaccharide Alters Behavior and Hippocampal Ionotropic Glutamate Receptor Expression in the Adult Rats after Psychogenic Trauma <i>V. A. Nikitina, M. V. Zakharova, A. N. Trofimov, A. P. Schwarz, G. V. Beznin, S. G. Tsikunov, and O. E. Zubareva</i>	904
Blood-Brain Barrier Breakdown in Stress and Neurodegeneration: Biochemical Mechanisms and New Models for Translational Research (Review) <i>A. B. Salmina, Yu. K. Komleva, N. A. Malinovskaya, A. V. Morgun, E. A. Teplyashina, O. L. Lopatina, Ya. V. Gorina, E. V. Kharitonova, E. D. Khilazheva, and A. N. Shuvaev</i>	917
Monoamine Oxidase as a Potential Biological Marker for the Therapy Efficacy of Mental Disorders (Review) <i>M. G. Uzbekov</i>	933

УДК 577.25, 577.171.6

## РОЛЬ ИЗМЕНЕНИЙ ЭКСПРЕССИИ HOMER1 В ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К СТРЕССУ

### Обзор

© 2021 В.В. Решетников<sup>1,2\*</sup>, Н.П. Бондарь<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия;  
электронная почта: vasilyreshetnikov@bionet.nsc.ru

<sup>2</sup> Научно-технологический университет «Сириус», 354340 Сочи, Россия

<sup>3</sup> Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 05.10.2020

После доработки 25.02.2021

Принята к публикации 05.03.2021

Стресс нарушает процессы синаптической пластичности и является значимым фактором риска различных психических расстройств, таких как депрессия и тревожное расстройство. Homer1 является важным компонентом постсинаптической плотности — конститутивно экспрессирующиеся длинные изоформы Homer1b и Homer1c связывают метаботропные рецепторы глутамата первой группы mGluR1 и mGluR5 и другие эффекторные белки, формируя постсинаптический белковый скаффолд. Активация mGluR1/5 — Homer1b/c регулирует активность NMDA- и AMPA-рецепторов, а также гомеостаз Ca<sup>2+</sup>, модулируя таким образом различные формы синаптической пластичности. Как результат индуцируемой альтернативной термации трансляции образуется белок Homer1a с доминантно-негативными свойствами. Экспрессия усеченной изоформы в ответ на активацию нейрона приводит к нарушению взаимодействия Homer1b/c с адаптерными белками, активирует лиганд-независимую сигнальную трансдукцию через mGluR1/5, приводит к подавлению AMPA- и NMDA-опосредованной передачи сигнала и, таким образом, запускает ремоделинг постсинаптического белкового скаффолда, подавляя долговременную потенциацию. Исследования на животных моделях подтверждают, что Homer1a-зависимый ремоделинг, по всей видимости, играет важную роль в чувствительности к стрессу, а сам Homer1a может рассматриваться как нейропротектор. В данном обзоре мы исследуем влияние различных животных моделей стресса на экспрессию Homer1, а также вклад генетических вариантов HOMER1 у людей в поведение, структурные и функциональные особенности мозга.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** стресс, депрессия, синаптическая пластичность, Homer1, метаботропные рецепторы глутамата.

DOI: 10.31857/S0320972521060014

### ВВЕДЕНИЕ

Стресс нарушает баланс между возбуждающими и тормозными сигналами в головном мозге, который поддерживается главным образом путем изменения активности глутаматергической (возбуждающей) и ГАМКергической (ингибиторной) систем. Нарушение этого баланса приводит к морфологическим изменениям и реорганизации дендритной сети в различных структурах головного мозга [1]. Устойчивые отклонения уровня глутамата от нормы могут играть ключевую роль в долгосрочных структур-

ных и функциональных нарушениях синаптической пластичности, связанных с различными психическими расстройствами [2]. Нарушения активности глутаматергической системы обнаружены при различных заболеваниях, таких как депрессия [1–5], шизофрения [6–8] и расстройства аутистического спектра [9].

Ключевую роль в изменении синаптической пластичности в ответ на стресс играют белки постсинаптической плотности (postsynaptic density), включающие комплексы рецепторов, белки скаффолда, адаптерные белки, которые располагаются преимущественно в глутаматергических синапсах. Белки постсинаптической плотности модулируют передачу сигнала, объединяя синаптические сигналы от пресинаптических нейронов и различных нейротрансмиттерных систем, преимущественно посредством глутаматных рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDAR) и метаботропных рецепторов глута-

Принятые сокращения: AMPA —  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота; mGluR — метаботропный рецептор глутамата; mGluR1/5 — метаботропные рецепторы глутамата первой группы, 1 и 5; NMDA — N-метил-D-аспартат; LTD — долговременная депрессия; LTP — долговременная потенциация.

\* Адресат для корреспонденции.

мата первой группы (mGluR1 и mGluR5). Скаффолд-белок Homer1 связывается с mGluR1, mGluR5 [10] и адаптерными белками, в частности с семейством скаффолд-белков Shank [10], фосфолипазой С-бета [11, 12], рецептором 1-4-5-инозитолтрифосфата (IP3) [13, 14], TRPC-каналами (transient receptor potential canonical) [13, 14], рианодиновыми рецепторами RyRs [15] и селективно с  $Ca^{2+}$ -каналами L-типа [16], регулируя передачу сигнала, гомеостаз  $Ca^{2+}$ , долговременную потенциацию (long-term potentiation, LTP) и долговременную депрессию (long-term depression, LTD) [17, 18]. Поскольку нарушения передачи глутамата наблюдаются при множестве стресс-индуцированных патологий, мы предположили, что Homer1 может рассматриваться как важный компонент чувствительности/устойчивости к стрессу. Работы последних двух десятилетий демонстрируют, что изменение экспрессии Homer1 или его доминантно-негативной изоформы Homer1a наблюдается у животных после стресса ограничения подвижности (restrain stress) [19], стресса социальных поражений (social defeat stress) [20], а также у взрослых животных, подвергнутых пренатальному стрессу (prenatal stress) [21]. Кроме того, показано, что экспрессия Homer1 изменяется после терапии анксиолитиками и антидепрессантами [22]. Тем не менее, несмотря на интенсивное изучение Homer1 в синаптической пластичности, все еще мало известно, какую роль играет изменение соотношения его изоформ в чувствительности к стрессу, а также при стресс-индуцированных психических расстройствах.

### СТРУКТУРА HOMER1

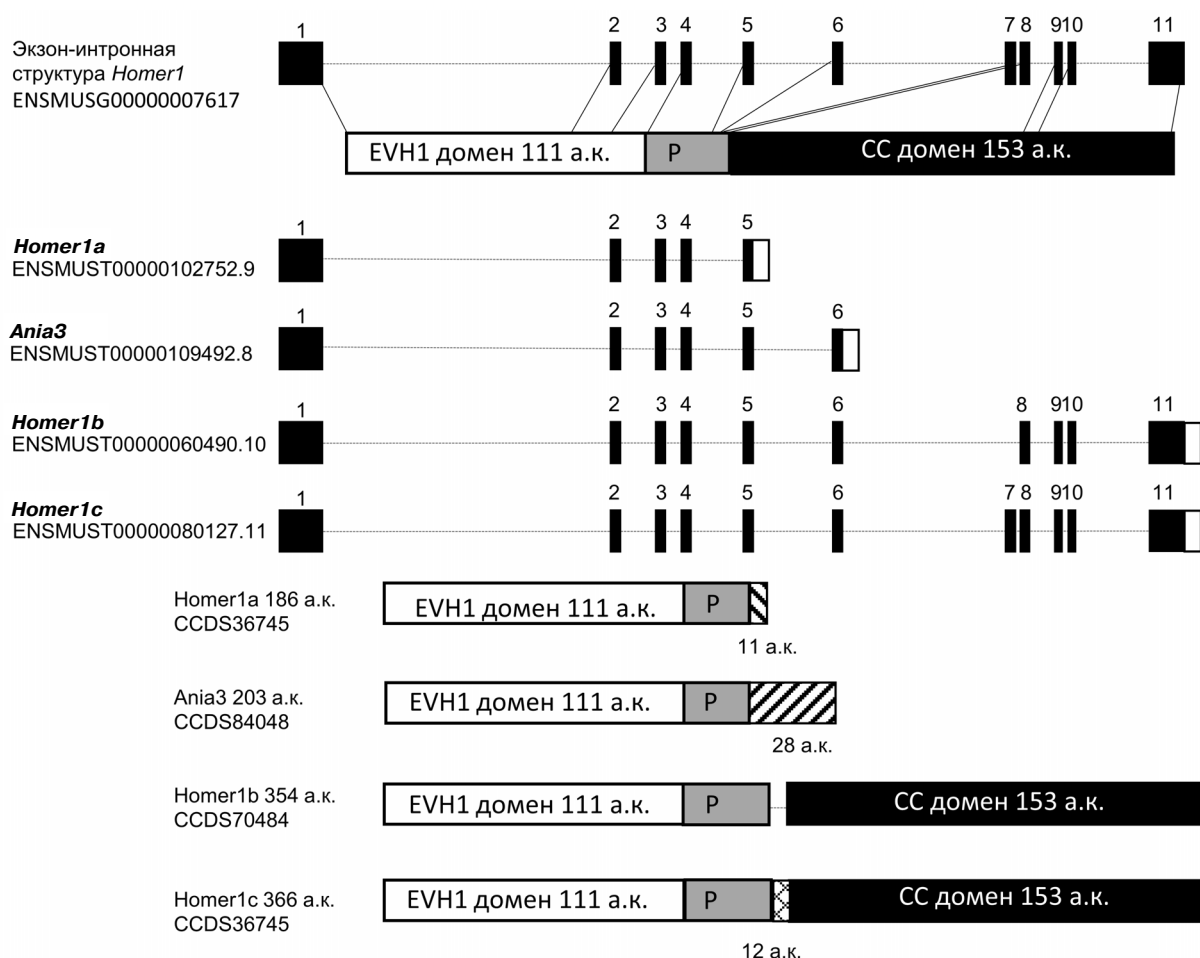
Homer1 имеет 9 белковых изоформ, 3 из которых (Homer1b, Homer1c и Homer1d) являются «длинными» изоформами, содержащими все функциональные домены; у двух других (Homer1a и Ania3 (Homer1m)) отсутствует С-концевой домен; у 4 изоформ (Homer1e, f, g и h) отсутствуют частично или полностью оба функциональных домена [23]. В нашем обзоре мы остановимся на 4-х наиболее изученных изоформах (Homer1a, Homer1b, Homer1c и Ania3), поскольку только для них показана функциональная активность.

В состоянии покоя в нейронах ген *Homer1* транскрибируется с образованием конститутивных транскриптов *Homer1b/c*. Активация нейронов стимулирует транскрипцию генов раннего ответа (immediate early genes), в частности коротких транскриптов *Homer1a* и *Ania3*, экспрессия которых обеспечивает адаптацию к стрессу

на молекулярном уровне. Механизм переключения экспрессии с длинных транскриптов на короткие не полностью ясен; считается, что он может быть связан с преждевременной остановкой РНК-полимеразы II, расщеплением мРНК и полиаденилированием образовавшегося 3'-конца [24]. Показано, что важную роль в этом играет транскрипционный фактор MEF2 и регуляторная последовательность TTGTTGGG, расположенная рядом с участком терминации транскрипции коротких изоформ *Homer1* [24].

Homer1 имеет консервативный регион, включающий в себя N-концевой EVH1 (WH1, RanBP1-WASP) домен, который связывает консенсусную пролин-богатую последовательность (Pro-Pro-X-X-Phe), а также так называемый пролиновый мотив (P-мотив) — последовательность из 5 аминокислот (Ser-Pro-Leu-Thr-Pro) [23]. Домен EVH1 связывается со множеством адаптерных белков, рецепторов и лигандов (см. подробные обзоры [18, 23]). P-Мотив также может связываться и с EVH1-доменом, однако сродство с пролин-богатой последовательностью значительно сильнее [25]. В связи с этим P-мотив связывается с соседними EVH1-доменами только в отсутствие доступных Pro-Pro-X-X-Phe мотивов, препятствуя мультимеризации комплексов Homer1–рецептор/эффекторный белок. Таким образом, P-мотив играет важную роль в регуляции кластеризации Homer1 [25].

У длинных изоформ (Homer1b, Homer1c) также есть С-концевой (coiled-coil, CC) домен, обеспечивающий мультимеризацию этих изоформ за счет связывания между собой специфических мотивов типа лейциновая застежка (leucine zipper) [26]. Изоформы Homer1b и Homer1c имеют схожую структуру и функции, отличаясь только последовательностью из 12 аминокислотных остатков, функциональная роль которых до конца не выяснена (рис. 1). Мультимерные комплексы Homer1b/c позволяют связывать множество различных эффекторных белков, обеспечивая высокую скорость синаптической передачи на постсинаптической мембране. У транскриптов *Homer1a* и *Ania3* отсутствует последовательность, кодирующая CC-домен, однако в 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) содержится множество AUUUA-повторов, характерных для генов раннего ответа [26, 27]. Наличие таких повторов снижает стабильность мРНК, что приводит к ее селективной деградации [28]. Усеченные транскрипты содержат 5–6 экзонов вместо 10 у полноразмерных *Homer1b* и *Homer1c*. Homer1a и *Ania3* отличаются друг от друга С-концевой последовательностью (рис. 1), чья функциональная роль также не ясна. Однако следует отметить, что паттерн



**Рис. 1.** Структура транскриптов *Homer1* и его белковых изоформ. *Homer1* содержит 11 экзонов. Первые 4 экзона кодируют EVH1-домен; 5-й экзон – Р-мотив; 8–11 экзоны кодируют СС-домен

экспрессии мРНК *Homer1a* и *Ania3* в ответ на нейрональную активацию различен: экспрессия мРНК *Homer1a* достигает пика уже через час, в то время как *Ania3* – только через 4 ч [29].

Отсутствие СС-домена у изоформ *Homer1a* и *Ania3* не позволяет им образовывать олигомерные комплексы друг с другом, однако наличие EVH1-домена обеспечивает их взаимодействие с пролин-богатыми мотивами различных рецепторов, в том числе mGluR1/5 и адаптерными белками. Таким образом, обе короткие изоформы выполняют доминантно-негативную роль, «захватывая» целевые для *Homer1b* и *Homer1c* молекулы и приводя к диссоциации белковых комплексов с *Homer1b/c* на постсинаптической мембране. Нарушение связей *Homer1b/c*, индуцированное *Homer1a*, приводит к снижению внутриклеточной концентрации Ca<sup>2+</sup> [30] и ингибированию путей сигнальной трансдукции, что в совокупности способствует ремоделированию постсинаптической плотности. Следует отметить, что во многих работах короткие изофор-

мы не разделяют на *Homer1a* и *Ania3*, как и длинные – на *b* и *c*, поэтому функциональная роль отдельных изоформ остается малоисследованной.

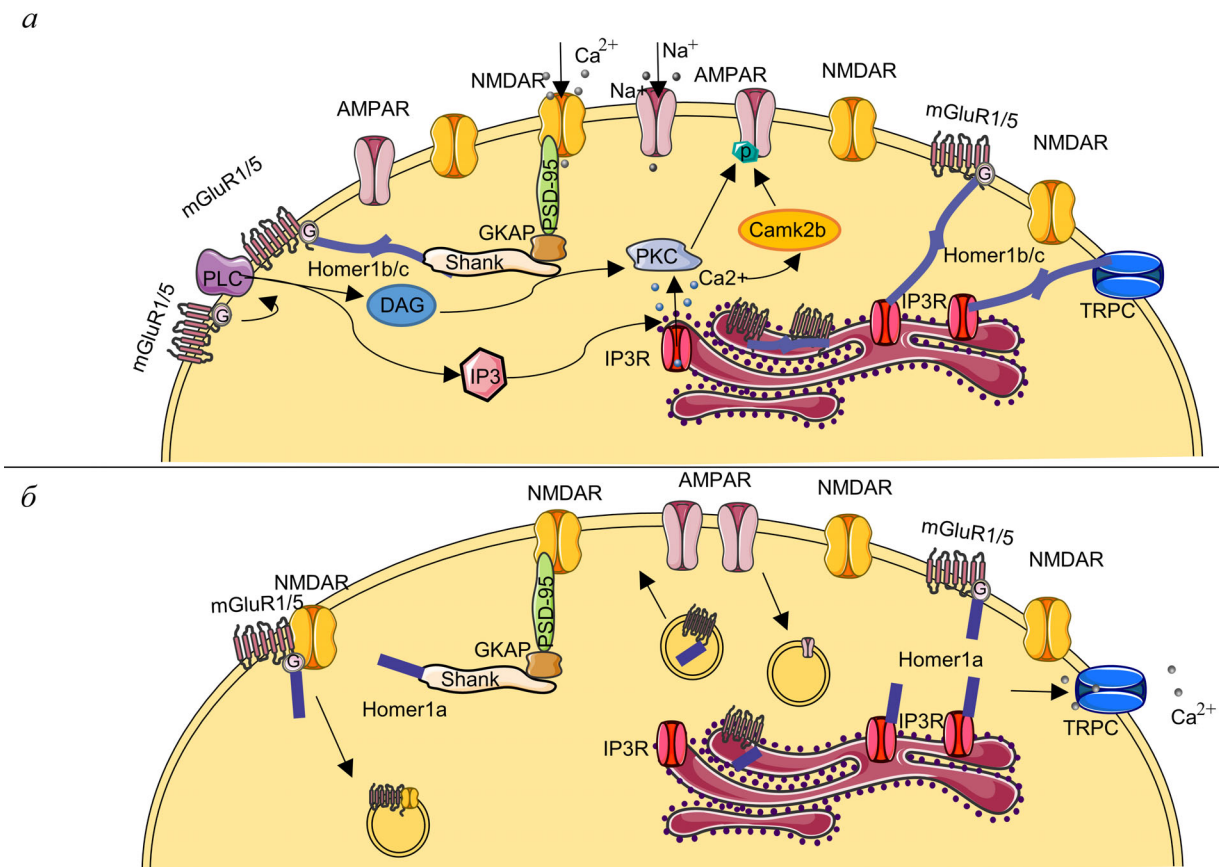
### РОЛЬ НОМЕР1 В СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ

Скорость и длительность синаптической передачи, а также способность адекватной реакции клетки в ответ на внешние стимулы являются неотъемлемыми компонентами синаптической пластичности. Несмотря на множество белковых взаимодействий *Homer1*, вероятнее всего его основная роль в синаптической пластичности связана с взаимодействием с mGuR1/5 [10, 17, 18, 26, 31]. Комплексы mGluR1/5 – *Homer1b/c* являются необходимыми компонентами осуществления LTP [32], LTD [33–35] и депотенциации [36]. Следует отметить, что молекулярные механизмы mGluR1/5-опосредованного запуска

LTP и LTD схожи и, по всей вероятности, запуск LTP или LTD определяется активностью других компонентов системы [32]. Каноническая передача сигнала mGluR1/5 происходит через активацию фосфолипазы C субъединицей G $\alpha$ , продукта диссоциации гетеродимерного комплекса G-белка mGluR1/5 в результате связывания лиганда с рецептором (рис. 2, *a*) [37]. Фосфолипаза C стимулирует гидролиз фосфоинозитидов с образованием инозитол-1,4,5-трифосфата (IP $_3$ ) и диацилглицерола (DAG). IP $_3$ , связываясь со своими рецепторами на поверхности эндоплазматического ретикулума, приводит к высвобождению Ca $^{2+}$  во внутриклеточное пространство;

DAG, в свою очередь, активирует протеинкиназу C [38]. Оба этих механизма лежат в основе mGluR1/5-опосредованной активации сигнального пути через митоген-активируемую киназу (MAPK), механистическую мишень рапамицина (mTOR) и белок, связывающий сAMP-чувствительный элемент (сAMP-CREB) [38–40]. Помимо этого, протеинкиназа C наряду с Ca $^{2+}$ -индуцируемой киназой Camk2b напрямую фосфорилируют C-конец субъединиц AMPA-рецептора, обеспечивая их стабильность на постсинаптической мембране.

Агломераты mGluR1/5–Homer1b/c располагаются в пресинаптической области или встроены



**Рис. 2.** Схематическое изображение постсинаптической мембраны и роли Homer1. *a* – Конститутивно экспрессирующаяся изоформа Homer1b/c обеспечивает взаимосвязь mGluR1/5 с NMDAR через белок-белковые комплексы Shank – GKAP – PSD-95, а также связь mGluR1/5 и кальциевых каналов TRPC с IP3R на постсинаптической мембране. Формирование скаффолда Homer1b/c с другими белками способствует долговременной потенциации и эффективной сигнальной трансдукции. Высвобождение депонированного Ca $^{2+}$  из эндоплазматического ретикулума во внутриклеточное пространство приводит к активации протеинкиназы Camk2b, которая совместно с протеинкиназой C участвует в фосфорилировании C-конца субъединиц AMPAR. Такое взаимодействие препятствует эндоцитозу AMPAR, способствуя их стабилизации на поверхности постсинаптической мембраны. *б* – Молекулярные механизмы Homer1a-зависимого снижения синаптической передачи (downscaling). Короткая изоформа Homer1a конкурирует с Homer1b/c за сайты связывания, приводя к нарушению мультимерных комплексов mGluR1/5–Homer1b/c–Shank и mGluR1/5–Homer1b/c–IP3R, приводя к переключению активации mGluR1/5 на лиганд-независимую форму. Комплексы mGluR1/5–Homer1a способны ингибировать активность NMDAR с помощью  $\beta$ -субъединицы G-белка mGluR1/5, приводя к их эндоцитозу. Снижение уровня протеинкиназ приводит к уменьшению фосфорилирования субъединиц AMPAR, что приводит к их последующему эндоцитозу, поскольку нефосфорилированные формы менее стабильны. (С цветными вариантами рис. 2 и 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

ны в мембрану эндоплазматического ретикулума [40, 41]. Мультимерные комплексы Homer1b/c посредством белок-белковых взаимодействий способны образовывать регуляторные сети, такие как mGluR1/5 – Homer1b/c – Shank – GKAP – PSD-95. Последние повышают эффективность сигнальной трансдукции через NMDAR и являются структурными компонентами постсинаптической плотности [18, 42, 43]. Кроме того, связывание комплекса mGluR1/5–Homer1b/c с эндоплазматическими рецепторами IP3 обеспечивает регуляцию гомеостаза  $Ca^{2+}$  [44]. Таким образом, взаимодействие с различными адаптерными белками в постсинаптической плотности, а также необходимость участия Homer1b/c для созревания дендритных шипиков [44–46] свидетельствуют в пользу того, что Homer1b/c необходим в создании «арматуры» постсинаптической плотности.

Короткая изоформа Homer1a конкурирует с Homer1b/c за связывание с адаптерными белками, приводя к диссоциации агломератов Homer1b/c – Shank – GKAP – PSD-95 в дозозависимой форме (рис. 2, б) [42]. Помимо этого, связывание Homer1a с эндоплазматическими mGluR1/5 приводит к их перемещению в постсинаптическое пространство [47], где они могут осуществлять прямое ингибирование передачи сигнала через NMDAR путем связывания  $\beta$ -субъединицы G-белка рецептора mGluR1/5 с C-концом NR1-субъединицы NMDAR [48, 49]. Повышение экспрессии Homer1a и нарушение взаимодействия Homer1b/c–mGluR1/5 приводит к запуску лиганд-независимой активации mGluR1/5 [17, 47, 50]. Активация этих глутаматных рецепторов приводит к снижению количества AMPAR на постсинаптической мембране за счет уменьшения фосфорилирования GluA2-субъединицы AMPAR и усилению их эндоцитоза (см. детальный обзор механизма в работах [17, 18, 50, 51]). Индуцированное Homer1a снижение эффективности синаптической передачи за счёт действия mGluR1/5 лежит в основе так называемой гомеостатической синаптической пластичности, которая направлена на поддержание долгосрочной стабильности молекулярных сетей [52]. Таким образом, повышенная экспрессия Homer1a приводит к ремоделированию постсинаптической плотности. Функционально эти изменения сопровождаются подавлением долговременной потенциации и способствуют снижению эффективности синаптической передачи [53, 54], а также редукции размера синапса и количества зрелых шипиков в дендрите [46]. В противоположность этим данным, некоторые работы свидетельствуют о том, что экспрессия Homer1a усиливает синаптическую

передачу за счёт независимой от глутамата mGluR5-опосредованного усиления экспрессии и количества AMPAR на постсинаптической мембране [55, 56]. Механизм подобной активации глутаматергической передачи не ясен, поскольку в работе Holz et al. [56], как и других соответствующих исследованиях, показано, что усиление экспрессии Homer1a приводит к дефосфорилированию субъединиц AMPAR. При этом считается, что дефосфорилирование приводит к снижению количества AMPAR на постсинаптической мембране [57]. В связи с указанными данными мы считаем, что утверждение об усилении экспрессии Homer1a, приводящей к усилению AMPA-опосредуемой передаче сигнала, требуют дальнейшей проверки. Возможно, наблюдаемые в этих работах эффекты были вызваны методическими особенностями увеличения количества Homer1a. В частности, в работе Holz et al. [56] Homer1a был синтезирован в бактериальных клетках и доставлен в нейроны в составе белковой конструкции TAT–Homer1a. Согласно нашему предположению, такой способ может влиять на синаптическую пластичность ввиду избирательного проникновения Homer1a только в некоторые из множества различающихся синапсов [58].

### ОСТРЫЙ СТРЕСС ПРИВОДИТ К ИНДУКЦИИ ЭКСПРЕССИИ *Homer1a*

Острый стресс приводит к активации нейронов и значительно увеличивает скорость инициации транскрипции *Homer1* с образованием коротких транскриптов *Homer1a* и *Ania3* [27]. Показано, что тест условно-рефлекторного замирания (contextual fear conditioning) приводит к устойчивому усилению экспрессии *Homer1a* в различных регионах гиппокампа и миндалине, которое наблюдается уже через 30 мин после стрессового воздействия и сохраняется до 24 ч [59, 60] (таблица). Стресс, вызванный страхом хищника, также приводит к индукции экспрессии транскрипта *Homer1a* в различных регионах мозга, таких как гиппокамп, гипоталамус и миндалина [61]. Причем уровень экспрессии *Homer1a* в этих структурах коррелирует с длительностью реакции замирания (freezing) [61]. Интересно, что схожие результаты были получены после однократного воздействия стресса социального поражения (social defeat stress) у взрослых самцов мышины линии C57BL: в данном случае увеличения экспрессии *Homer1a* не наблюдалось, однако уровень транскрипта Homer1b/c был снижен. Вероятно, это привело к изменению соотношения Homer1a / Homer1b/c

## Стресс-индуцированные изменения в экспрессии Homer1

Вид (линия)	Возраст	Тип стрессора	Время стрессирования	Забор материала	Структура мозга	Методика	Экспрессия Homer1	Ссылки
Крысы Lister Hooded	взрослые ♂	модель условно-рефлекторного замирания (Contextual fear conditioning)	однократное	через 30 мин 1 ч 4 ч 24 ч	области CA1, CA3 и DG dHIP (Bregma -3,5 мм)	<i>in situ</i>	<i>Homer1b/c</i> – без изменений во всех исследованных регионах; <i>Homer1a</i> ↑ в CA1 через 30 мин, 2 и 4 ч DG ↑ через 30 мин; <i>Ania3</i> ↑ в CA1, CA3 и DG через 30 мин	[59]
Мыши C57BL/6J	взрослые (6–10 нед.) ♂	модель условно-рефлекторного замирания (Contextual fear conditioning)	однократное	через 2 ч	HIP; AMY	qPCR	<i>Homer1a</i> ↑ как в HIP, так и в AMY <i>Homer1c</i> без изменений	[60]
Крысы Sprague Dawley	взрослые ♂	воздействие хищника	однократное в течение 15 мин	через 1 ч	PVN (Bregma -1,80 мм); AMY, DG, CA1, CA3 (Bregma -3,14 мм)	<i>in situ</i>	<i>Homer1a</i> ↑ во всех структурах	[61]
Мыши C57BL/6N	взрослые (12 нед.) ♂	стресс социального поражения	однократное в течение 5 мин	через 1 ч 4 ч 8 ч 24 ч	CA1 зона гиппокампа	<i>in situ</i>	<i>Homer1a</i> без изменений ни в одной временной точке; <i>Homer1b/c</i> ↓ через 4 и 8 ч	[20]
Крысы Sprague Dawley	взрослые ♂	воздействие током (Foot shock)	40 мин	через 1 сут 7 сут 14 сут	HIP	qPCR; Western blotting	<i>Homer1</i> ↑ через 7 сут; <i>Homer1b/c</i> без изменений	[105]
Крысы Sprague Dawley	взрослые ♂	воздействие током (Foot shock)	40 мин	через 24 ч 7 сут 14 сут	mPFC	qPCR	<i>Homer1b/c</i> ↓ через 24 ч	[62]
Крысы Wistar	взрослые ♂	стресс ограничения подвижности	повторяющееся 6 ч/сут в течение 21 сут	через 18 ч	HIP	Western blotting	<i>Homer1b/c</i> ↑	[63]
Крысы Wistar	взрослые ♂	стресс ограничения подвижности	повторяющееся 6 ч/сут в течение 21 сут	через 18 ч	HIP	qPCR	<i>Homer1b/c</i> ↑	[19]
Мыши C57BL/6N	взрослые (12 нед.) ♂	стресс социального поражения	повторяющееся 1 раз в сут в течение 21 сут	через 24 ч	DG, CA1, CA3 зоны dHIP	<i>in situ</i>	<i>Homer1b/c</i> ↑ в CA1, CA3; <i>Homer1a</i> без изменений	[64]
Мыши C57BL/6N	взрослые (7–8 нед.) ♂	стресс социального поражения + стресс ограничения подвижности	повторяющееся 1 раз в сут в течение 10 сут + повторяющееся 2 ч/сут в течение 21 сут	через 120 ч через 72 ч	mPFC, HIP, AMY HIP	qPCR; Western blotting	<i>Homer1b/c</i> ↑ в HIP у животных, чувствительных к стрессу социального поражения <i>Homer1a</i> без изменений <i>Homer1b/c</i> ↑ HIP	[65]
Крысы Wistar	взрослые (170 г) ♂	хронический мягкий стресс	повторяющееся в течение 42 сут	N/A	FC	qPCR	<i>Homer1b/c</i> ↓	[68]
Крысы Wistar	подростки (5–6 нед.) ♂	хронический мягкий стресс	повторяющееся в течение 56 сут	N/A	mPFC	протеомный анализ	<i>Homer1b/c</i> ↑	[69]



Окончание таблицы

Вид (линия)	Возраст	Тип стрессора	Время стрессирования	Забор материала	Структура мозга	Методика	Экспрессия Homer1	Ссылки
Мыши C57BL/6J	взрослые (8–10 нед.) ♂	хронический мягкий стресс	повторяющееся в течение 57 сут	через 120 ч	HIP; PFC	Western blotting	Homer1a ↓ в HIP и PFC	[66]
Мыши C57BL/6J	взрослые (15–16 нед.) ♂	стресс социального поражения + комбинация раннего постнатального и стресса социально-го поражения во взрослом возрасте	стресс социальных поражений 1 раз в день в течение 15 сут; ранний постнатальный: отделение детенышей от матерей на 3 ч 1 раз в день со 2 по 14 постнатальный день	через 48 ч после последней социальной конфронтации	PFC	RNA-seq; qPCR	Homer1a ↓ у группы с комбинацией стрессов	[67]
Мыши C57BL/6J	взрослые (12–15 нед.) ♀	ранний постнатальный стресс	отделение детенышей от матерей на 15 мин или 180 мин 1 раз в день со 2 по 14 постнатальный день	во взрослом возрасте	dHIP (Bregma –1,86 – –2,16 мм); PFC	qPCR	Homer1a без изменений в обеих группах; Homer1b/c без изменений в обеих группах	[74]
Мыши C57BL/6J	взрослые (12–15 нед.) ♂	ранний постнатальный стресс	отделение детенышей от матерей на 180 мин 1 раз в день со 2 по 14 постнатальный день + однократное отделение от матерей на 24 ч на 9 постнатальный день	во взрослом возрасте	PFC	RNA-seq	у группы с хроническим постнатальным стрессом общая экспрессия Homer1 ↓, но Homer1a и Homer1b/c по отдельности не были изменены; у группы с однократным отделением Homer1, Homer1a, Homer1b/c без изменений	неопубликованные результаты, NCBI BioProject PRJNA649640
Мыши C57BL/6	детеныши (15 сут) ♂	ранний постнатальный стресс	отделение детенышей от матерей на 180 мин 1 раз в день со 2 по 14 постнатальный день + однократное отделение от матерей на 24 ч на 9 постнатальный день	на 15-й постнатальный день	PFC	RNA-seq	Homer1, Homer1a, Homer1b/c без изменений в обеих группах (с однократным и хроническим отделением)	неопубликованные результаты, NCBI BioProject PRJNA649640
Крысы Sprague Dawley	ювенильные (21 сут) ♀	пренатальный стресс, связанный с ограничением подвижности матери	повторяющееся (3 раза в сут по 30 мин на протяжении 7 последних дней гестации)	на 21-й постнатальный день	AMY; HIP; PFC	Western blotting	Homer1a ↑ в AMY, HIP и PFC; Homer1b/c ↑ в PFC	[73]
Крысы Sprague Dawley	взрослые (17 нед.) ♂	пренатальный стресс, связанный с ограничением подвижности матери	повторяющееся (3 раза в сут по 45 мин, начиная с 11-го дня гестации)	во взрослом возрасте	AMY; dHIP; PFC	in situ	Homer1a ↑ AMY и ↓ в HIP и PFC; Homer1b/c ↓ в AMY	[21]

Примечание. PVN – паравентрикулярные ядра гипоталамуса, AMY – миндалина, HIP – гиппокамп, dHIP – дорсальный гиппокамп, PFC – префронтальная кора, mPFC – медиальная префронтальная кора, ↑ – усиление экспрессии, ↓ – снижение экспрессии, N/A – нет данных.

в дорсальном гиппокампе и сопровождалось нарушениями пространственной памяти [20]. Однако эти негативные эффекты стресса на пространственную память были нивелированы как с помощью направленной оверэкспрессии транскрипта *Homer1b/c* в дорсальном гиппокампе, так и после введения антагониста mGluR5 (3-метил-4-тиазолил-этинил-пиридин, МТЕР) за 5 мин до процедуры стресса социального поражения [20]. У крыс, на которых воздействовали электрическим током (foot shock), в префронтальной коре была снижена экспрессия *Homer1b/c* через 24 ч после воздействия [62]. В целом, индукция экспрессии изоформы *Homer1a* вне зависимости от типа стресса наблюдается в ответ на различные типы стимулов, такие как химически индуцированная нейрональная деполяризация, эпилептическая активность, травматическое повреждение, использование психостимуляторов, физическая активность и, наконец, стресс, вызванный негативными факторами окружающей среды или новой обстановкой (см. обзоры [18, 22]). Таким образом, предположительно, индукция экспрессии *Homer1a* при остром стрессе неспецифична и играет роль в подавлении ЛТР и ремоделинге синоптической плотности.

### РОЛЬ *Homer1* В АДАПТАЦИИ К ХРОНИЧЕСКОМУ СТРЕССУ

Хронический, как и острый, стресс также влияет на уровень экспрессии различных изоформ *Homer1*. Так, у крыс, подвергнутых хроническому стрессу ограничения подвижности (6 ч/день в течение 21 дня), в гиппокампе было повышено содержание изоформы *Homer1b/c* [63] и уровень мРНК этих транскриптов [19] через 18 ч после последней процедуры стресса. Аналогичные изменения в экспрессии *Homer1b/c* в дорсальном гиппокампе наблюдались и после хронического стресса социальных поражений [64]. Помимо этого, в работе Wagner et al. [64] было показано, что хронический стресс социальных поражений приводит к снижению числа комплексов *Homer1b/c*–mGluR5 по сравнению с контролем, при том что содержание самих белков *Homer1b/c* и mGluR5 между группами было схожим. Элегантное исследование на мышах [65] показало, что у животных, чувствительных к хроническому стрессу социальных поражений, и у животных с хроническим стрессом ограничения подвижности наблюдается схожее повышение экспрессии *Homer1b/c* в гиппокампе. Уровень экспрессии этой изоформы имел негативную корреляцию с

параметрами социального поведения (social interaction ratio) и позитивную корреляцию с параметрами депрессивно-подобного поведения (sucrose preference), которые были оценены у этих животных после хронического стресса. Кроме того, авторы этого исследования показали, что у животных, чувствительных к хроническому стрессу социальных поражений, наблюдается усиление mGluR-опосредованной долговременной депрессии и снижение уровня экспрессии субъединиц AMPA-рецепторов (*GluA1*, *GluA2*). Авторы предполагают, что повышение сигналинга, опосредованного комплексом mGluR–*Homer1b/c*, приводит к высвобождению  $Ca^{2+}$  из эндоплазматического ретикулума, который, в свою очередь, активирует PERK–eIF2 $\alpha$  и CREB сигнальный путь в гиппокампе: уровень фосфорилированных форм PERK, eIF2 $\alpha$  и CREB оказался повышен у группы чувствительных к стрессу животных. Аналогичные эффекты были получены на модели хронического мягкого стресса (chronic mild stress), который приводил к снижению уровня *Homer1a* в гиппокампе и префронтальной коре, что сопровождалось выраженным депрессивно-подобным поведением [66]. Длительное воздействие высокочастотной транскраниальной магнитной стимуляции (15 или 25 Гц с 30-го по 57-й день стрессирования), которая используется в терапии различных неврологических и психических заболеваний, сглаживает эффекты стресса как на поведенческом уровне, так и на уровне экспрессии *Homer1a* в различных структурах мозга [66]. Поскольку известно, что *Homer1a* является доминантно-негативной изоформой, можно предположить, что снижение ее количества приводит к усилению *Homer1b/c*-опосредованной передачи сигнала. Аналогичное снижение экспрессии *Homer1* в префронтальной коре взрослых самцов мышей, главным образом за счет снижения уровня *Homer1a*, было показано также в нашей работе после воздействия хронического стресса социальных поражений [67].

Однако не во всех структурах мозга наблюдаются аналогичные эффекты хронического стресса на соотношение *Homer1a* / *Homer1b/c*. В вышеописанной работе Li et al. [65] на животных с хроническим стрессом социальных поражений авторы продемонстрировали изменение экспрессии *Homer1b/c* только в гиппокампе, в то время как уровень *Homer1b/c* и *Homer1a* в префронтальной коре и миндалине оставался неизменным. Хронический мягкий стресс в течение 6 недель приводит к снижению уровня *Homer1b/c* во фронтальной коре [68]. Протеомный анализ также показал, что у крыс, устойчи-

вых к хроническому мягкому стрессу, уровень Homer1b/c в префронтальной коре выше, чем у чувствительных животных [69]. Можно предположить, что подобные различия в эффектах хронического стресса на экспрессию Homer1 могут быть связаны с регион-специфичностью, методологическими различиями, типом стресса, а также методом детекции уровня белка. Принимая во внимание все эти данные, можно заключить, что наиболее воспроизводимые эффекты различных типов хронического стресса связаны с увеличением уровня Homer1b/c и снижением соотношения Homer1a / Homer1b/c в гиппокампе, причем эти молекулярные изменения напрямую связаны с чувствительностью/устойчивостью животных к хроническому стрессу.

### ОТСРОЧЕННЫЕ ВО ВРЕМЕНИ ЭФФЕКТЫ СТРЕССА

Стресс в ранний период жизни (пренатальный и ранний постнатальный период) может оказывать влияние на чувствительность к нему в подростковом и взрослом возрасте. Молекулярные механизмы таких отсроченных во времени эффектов, по всей видимости, связаны с эпигенетическими изменениями, приводящими к изменению паттерна экспрессии генов [70, 71]. Экспрессия Homer1a в кортикальных структурах и гиппокампе последовательно увеличивается после рождения и достигает пика на 3-ю постнатальную неделю жизни у грызунов [31, 72]. Этот процесс совпадает с периодом интенсивной реорганизации синапсов и установления устойчивых синаптических сетей. В работе на крысах было показано, что хронический стресс в пренатальном периоде приводит к усилению экспрессии Homer1a в миндалине у ювенильных и взрослых животных [21, 73]. Однако если уровень Homer1a в гиппокампе и префронтальной коре ювенильных животных также был повышен [73], то у взрослых он был наоборот снижен [21]. Экспрессия Homer1a в гиппокампе и префронтальной коре прямо пропорционально коррелировала со временем, проведенным в светлой зоне в процессе теста светлой-темной коробки (light-dark box), в то время как экспрессия в миндалинах имела обратную корреляцию с этим параметром [21]. Наши исследования на моделях раннего постнатального стресса показали, что как хроническое отделение детенышей от матерей в течение первых двух недель жизни (по 3 ч в день), так и однократное отделение на 9-й постнатальный день (на 24 ч) не приводит к изменению уровня экспрессии Homer1 и транскриптов *Homer1a* и *Homer1b/c* в префронталь-

ной коре самцов мышей на 15-й постнатальный день. Однако важно отметить, что во взрослом возрасте у этих мышей наблюдается снижение общей экспрессии Homer1 без изменения соотношения коротких и длинных транскриптов (неопубликованные данные, NCBI BioProject PRJNA649640). Интересно, что совокупность наших результатов демонстрирует, что отсроченные эффекты раннего постнатального стресса наблюдаются только у самцов, но не у самок мышей [74]. Снижение совокупной экспрессии гена может являться свидетельством эпигенетических изменений, произошедших в его регуляторных регионах или в генах, белковые продукты которых являются регуляторами экспрессии Homer1. С помощью *in vitro* и *in vivo* подходов было показано, что эпигенетическая регуляция Homer1 зависит от BDNF-индуцируемого сигналинга (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) [75], который в значительной степени подвержен влиянию раннего постнатального стресса [76, 77]. Таким образом, стресс в ранний период жизни, по всей вероятности, не оказывает прямого влияния на переключение транскрипции Homer1b/c и Homer1a, однако может оказывать влияние на активность экспрессии Homer1, которая, в свою очередь, определяет амплитуду этого переключения.

### НOMER1 И ПСИХИЧЕСКИЕ РАССТРОЙСТВА

Данные, полученные с помощью полногеномного поиска ассоциаций (GWAS), свидетельствуют в пользу наличия связи некоторых полиморфизмов, расположенных в регуляторных районах гена *HOMER1* человека, с депрессией [78, 79] и суицидальным поведением [80, 81]. Функциональная роль таких полиморфизмов остается не до конца изученной, однако с помощью различных биоинформатических подходов удалось предсказать возможные сайты связывания транскрипционных факторов, таких как SEBPА, REL, NFKB1, которые могут быть нарушены в случае полиморфных замен [79, 81]. Данные функциональной магнитной томографии (fMRI) показали, что наличие полиморфизма rs7713917 у человека приводит к сниженной активации префронтальной коры в процессе ожидания вознаграждения [78] и к повышенной активации – в ответ на эмоциональный стимул [82], что может свидетельствовать о снижении уровня мотивации и усилении импульсивности. Кроме того, носители такого аллеля медленнее переключали внимание в ответ на негативные стимулы, что может свидетель-

ствовать о нарушении в процессах исполнительного контроля [83]. Помимо функциональных изменений, у носителей аллеля риска (A) rs7713917 был снижен объем медиальной префронтальной коры и показатели фракционной анизотропии (fractional anisotropy) в лобном тракте [82]. Подобные структурные особенности могут свидетельствовать о снижении уровня миелинизации, что часто ассоциировано со стресс-индуцированными психическими расстройствами [84]. Следует отметить, что результаты постмортальных исследований демонстрируют схожий уровень экспрессии HOMER1 у тех, кто был подвержен депрессии при жизни и условно здоровых людей. Лишь недавнее исследование показало, что уровень HOMER1A в интернейронах стриатума был повышен у пациентов, склонных к депрессии, по сравнению с условно здоровыми индивидуумами [85]. Более того, у депрессивных пациентов часто обнаруживаются регион-специфичные изменения экспрессии mGLUR1 и mGLUR5 [5, 86], что также может свидетельствовать о нарушении HOMER1-опосредованного сигналинга. Роль HOMER1 в устойчивости к психическим заболеваниям также подтверждается тем, что носители аллелей риска гена *HOMER1* получают меньший эффект от терапии антидепрессантами [82, 87].

### АКТИВАЦИЯ *Homer1a* И НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ

Представленные нами данные свидетельствуют о том, что острый стресс приводит в основном к усилению экспрессии *Homer1a* в различных регионах мозга, в то время как хронический стресс наиболее часто приводит к усилению экспрессии изоформ *Homer1b/c* в гиппокампе. Примечательно, что изменения в соотношении *Homer1a* и *Homer1b/c* в гиппокампе или префронтальной коре могут определять устойчивость/чувствительность к стрессу [65, 67]. Эти данные хорошо согласуются с предыдущими работами, в которых показано, что индукция *Homer1a* в кортикальных структурах позволяет лучше приспособиться к стрессовым условиям [88] и оказывает выраженный антидепрессивный эффект [22, 89–91]. При этом усиление экспрессии *Homer1a* наблюдается как при терапии фармацевтическими препаратами [22], так и с помощью других воздействий, таких как транскраниальная магнитная стимуляция [89], электроконвульсивная терапия [91], депривация сна [91] и фототерапия [90].

В то же время данные экспериментов на животных по отсроченным эффектам стресса гово-

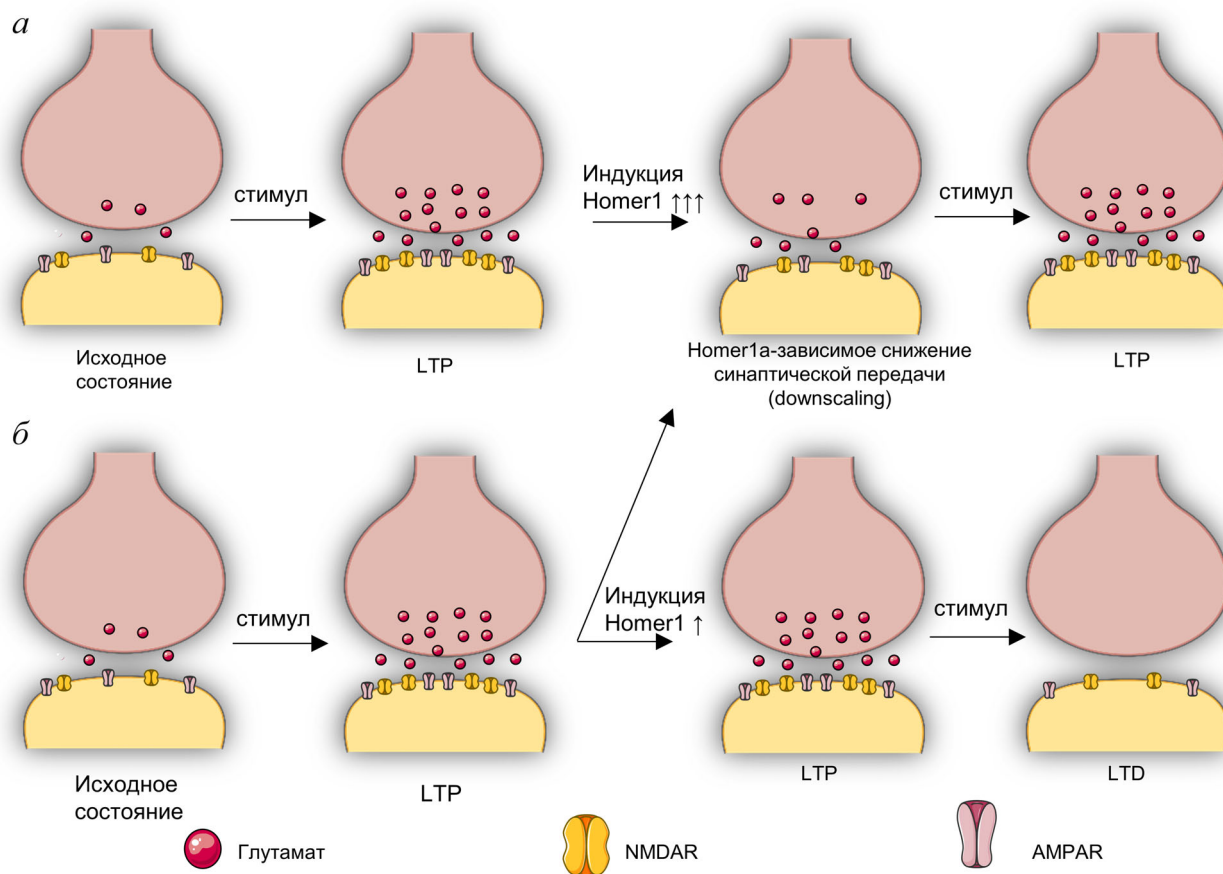
рят том, что поведенческие нарушения и повышение чувствительности к стрессу могут быть связаны с изменением общей экспрессии *Homer1*, а не с изменением соотношения *Homer1a* к *Homer1b/c*. Однако можно предположить, что именно низкая скорость индукции *Homer1a* может быть причиной негативных поведенческих эффектов, поскольку именно действие короткой изоформы связывают с устойчивостью к стрессу. Подтверждение нашему предположению можно найти в работах на животных с нокаутом гена *Homer1*, демонстрирующие снижение исследовательской активности, повышение тревожности, ухудшение адаптивного поведения в тесте вынужденного плавания, а также нарушение сенсомоторных реакций и когнитивных функций [92, 93]. Однако восстановление экспрессии одной лишь изоформы *Homer1a* в префронтальной коре путем введения векторной конструкции нивелирует большинство негативных поведенческих эффектов у этих животных [93]. В то же время восстановление экспрессии *Homer1b/c* в префронтальной коре не приводит к каким-либо поведенческим улучшениям.

Каковы же молекулярные механизмы подобных эффектов *Homer1a*? На этот вопрос пока нет точного ответа. Поскольку *Homer1b/c* способен к модуляции различных форм синаптической пластичности в отличие от *Homer1a*, вероятнее всего, такие эффекты не могут объясняться только лишь изменением скорости синаптической передачи. Недавно показано, что антидепрессивные эффекты, вызванные индукцией *Homer1a*, связаны с активацией сигнального каскада ERK, причем как через BDNF–Ras–ERK, так и через A1R–ERK1/2 пути [22]. В вышеописанной работе Li et al. [65] авторы демонстрируют, что усиление чувствительности к стрессу связано с активностью PERK–eIF2 $\alpha$  пути в гиппокампе. Следует отметить, что активация *Homer1a* в разных структурах мозга, таких как префронтальная кора и гиппокамп, может иметь противоположный эффект в стресс-индуцированном депрессивном поведении [94]. Более того, эффекты *Homer1a* на чувствительность к стрессу могут также зависеть от степени специфичности индукции экспрессии *Homer1a* – активируется ли она только в одной области мозга или сразу в нескольких [95].

Интересно, что вызванное индукцией *Homer1a* подавление LTP и синаптической передачи плохо согласуется с общепринятой концепцией двухфазного изменения активности глутаматергической передачи, вызванной стрессом [96–98]. Эта концепция предполагает, что острый стресс усиливает высвобождение глутамата,

встраивание AMPA- и NMDA-рецепторов в постсинаптическую мембрану, в то время как хронический стресс ассоциирован со снижением количества глутаматных рецепторов на постсинаптической мембране и подавлением передачи сигнала с помощью глутамата. Одно из возможных объяснений непоследовательности эффектов активации экспрессии *Homer1a* на AMPA-сигналинг может быть связано с различными временными профилями стрессорного ответа [99] и с так называемым двухфазным ремоделингом архитектуры постсинаптической мембраны [100], который предполагает, что длительная стимуляция глутаматом изначально (через 30–60 мин) приводит к нарушению *Homer1b/c*-содержащих постсинаптических кластеров, но спустя 4–8 ч наблюдается увеличение плотности кластеров относительно уров-

ня до начала воздействия. В этом контексте можно рассматривать *Homer1a*-зависимый ремоделинг как важный компонент «переключения» синаптической передачи, а индукцию экспрессии *Homer1a* – как адаптацию клетки в ответ на aberrантную активацию глутаматергической передачи. Таким образом, *Homer1a* может выполнять нейропротекторную роль. В подтверждение этой гипотезы на культурах нейронов *in vitro* было показано, что *Homer1a* защищает нейроны от NMDA-опосредованного повреждения [101]. Кроме того, как оверэкспрессия *Homer1a*, так и снижение экспрессии *Homer1b/c* подавляет апоптоз в нейронах, подверженных травматическому воздействию, усиливает жизнеспособность клеток и стимулирует процессы аутофагии [102, 103]. Важность *Homer1a* как нейропротектора подтверждается также его



**Рис. 3.** Предполагаемая роль *Homer1a*-зависимого ремоделинга в устойчивости к стрессу в синаптической передаче. *а* – При высоком уровне индукции *Homer1a* (↑↑↑) в ответ на LTP происходит обратимое подавление синаптической передачи (downscaling), необходимое для защиты клетки от чрезмерной активации глутаматергической передачи и адаптации клетки для последующей LTP. Эта модель предположительно характерна для устойчивых к стрессовым воздействиям индивидуумов или непродолжительного стрессового воздействия. *б* – При низком уровне индукции *Homer1a* (↑) в ответ на LTP, вероятно, лишь в части синапсов наблюдается *Homer1a*-зависимое подавление активности, другие же синапсы, по всей видимости, продолжают находиться в состоянии LTP, после чего неизбежно наступает фаза LTD, сопровождающаяся более глубоким ингибированием синаптической передачи. Эта модель предположительно характерна для более чувствительных к стрессовым воздействиям индивидуумов или ситуации хронического стресса

ролью в гомеостатической синаптической пластичности во время сна, которая включает в себя удаление AMPAR с постсинаптической мембраны и ингибирование LTP, обеспечивая снижение числа возбуждающих синапсов [104]. Тем не менее, несмотря на то что Homer1a приводит к подавлению LTP, описанные им изменения в подавлении синаптической передачи (downscaling) являются обратимыми и менее выраженными, чем LTD или депотенциация [36].

Таким образом, по всей видимости, именно возможность быстрой адаптации синапсов благодаря Homer1a-зависимому ремоделингу постсинаптической плотности в ответ на стрессовые стимулы обеспечивает устойчивость и предотвращение более сильного ингибирования синаптической передачи в нейронных сетях (рис. 3),

ответственных за психоэмоциональное состояние. В этом контексте усиление экспрессии Homer1b/c, вызванное хроническим стрессом, может быть следствием, а не причиной снижения глутаматергического сигналинга и уровня активность-индуцируемой экспрессии Homer1a.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-15-10131).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Qiao, H., Li, M. X., Xu, C., Chen, H. B., An, S. C., and Ma, X. M. (2016) Dendritic spines in depression: what we learned from animal models, *Neural Plast.*, **2016**, 8056370, doi: 10.1155/2016/8056370.
2. Musazzi, L., Treccani, G., and Popolil, M. (2015) Functional and structural remodeling of glutamate synapses in prefrontal and frontal cortex induced by behavioral stress, *Front. Psychiatry*, **6**, 60, doi: 10.3389/Fpsyt.2015.00060.
3. Sanacora, G., Treccani, G., and Popoli, M. (2012) Towards a glutamate hypothesis of depression: an emerging frontier of neuropsychopharmacology for mood disorders, *Neuropharmacology*, **62**, 63-77, doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.07.036.
4. Gulyaeva, N. V. (2017) Interplay between brain BDNF and glutamatergic systems: a brief state of the evidence and association with the pathogenesis of depression, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 301-307, doi: 10.1134/S0006297917030087.
5. Deschwenden, A., Karolewicz, B., Feyissa, A. M., Treyer, V., Ametamey, S. M., et al. (2011) Reduced metabotropic Glutamate receptor 5 density in major depression determined by [ $^{11}$ C]-ABP688 positron emission tomography and postmortem study, *Curr. Neuropharmacol.*, **9**, 15-15.
6. Tsai, G. C., and Coyle, J. T. (2002) Glutamatergic mechanisms in schizophrenia, *Annu. Rev. Pharmacol.*, **42**, 165-179, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.42.082701.160735.
7. Engmann, O., Hortobágyi, T., Pidsley, R., Troakes, C., Bernstein, H. G., et al. (2011) Schizophrenia is associated with dysregulation of a Cdk5 activator that regulates synaptic protein expression and cognition, *Brain J. Neurol.*, **134**, 2408-2421, doi: 10.1093/brain/awr155.
8. Matosin, N., Fernandez-Enright, F., Lum, J. S., Engel, M., Andrews, J. L., et al. (2016) Molecular evidence of synaptic pathology in the CA1 region in schizophrenia, *Npj Schizophr.*, **2**, 16022, doi: 10.1038/Npjschz.2016.22.
9. Fatemi, S. H., Folsom, T. D., Kneeland, R. E., Yousefi, M. K., Liesch, S. B., and Thuras, P. D. (2013) Impairment of fragile X mental retardation protein-metabotropic glutamate receptor 5 signaling and its downstream cognates ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, amyloid beta A4 precursor protein, striatal-enriched protein tyrosine phosphatase, and homer 1, in autism: a postmortem study in cerebellar vermis and superior frontal cortex, *Mol. Autism*, **4**, 21, doi: 10.1186/2040-2392-4-21.
10. Tu, J. C., Xiao, B., Yuan, J. P., Lanahan, A. A., Loeffert, K., et al. (1998) Homer binds a novel proline-rich motif and links group I metabotropic glutamate receptors with IP3 receptors, *Neuron*, **21**, 717-726, doi: 10.1016/S0896-6273(00)80589-9.
11. Nakamura, M., Sato, K., Fukaya, M., Araishi, K., Aiba, A., et al. (2004) Signaling complex formation of phospholipase C beta 4 with metabotropic glutamate receptor type 1 alpha and 1,4,5-trisphosphate receptor at the perisynapse and endoplasmic reticulum in the mouse brain, *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 2929-2944, doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03768.x.
12. Hwang, J. I., Kim, H. S., Lee, J. R., Kim, E., et al. (2005) The interaction of phospholipase C-beta 3 with Shank2 regulates mGluR-mediated calcium signal, *J. Biol. Chem.*, **280**, 12467-12473, doi: 10.1074/jbc.M410740200.
13. Yuan, J. P., Kiselyov, K., Shin, D. M., Chen, J., Shcheynikov, N., et al. (2003) Homer binds TRPC family channels and is required for gating of TRPC1 by IP3 receptors, *Cell*, **114**, 777-789, doi: 10.1016/S0092-8674(03)00716-5.
14. Kim, J. Y., Zeng, W. Z., Kiselyov, K., Yuan, J. P., Dehoff, M. H., et al. (2006) Homer 1 mediates store- and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent translocation and retrieval of TRPC3 to the plasma membrane, *J. Biol. Chem.*, **281**, 32540-32549, doi: 10.1074/jbc.M602496200.
15. Hwang, S. Y., Wei, J., Westhoff, J. H., Duncan, R. S., Ozawa, F., et al. (2003) Differential functional interaction of two Ves1/Homer protein isoforms with ryanodine receptor type I: a novel mechanism for control of intracellular calcium signaling, *Cell Calcium*, **34**, 177-184, doi: 10.1016/S0143-4160(03)00082-4.
16. Yamamoto, K., Sakagami, Y., Sugiura, S., Inokuchi, K., Shimohama, S., and Kato, N. (2005) Homer 1a enhances spike-induced calcium influx via L-type calcium channels in neocortex pyramidal cells, *Eur. J. Neurosci.*, **22**, 1338-1348, doi: 10.1111/j.1460-9568.2005.04278.x.
17. Hu, J. H., Park, J. M., Park, S., Xiao, B., Dehoff, M. H., et al. (2010) Homeostatic scaling requires group I mGluR activation mediated by Homer1a, *Neuron*, **68**, 1128-1142, doi: 10.1016/j.neuron.2010.11.008.

18. Clifton, N. E., Trent, S., Thomas, K. L., and Hall, J. (2019) Regulation and function of activity-dependent homer in synaptic plasticity, *Mol. Neuropsychiatry*, **5**, 147-161, doi: 10.1159/000500267.
19. Orłowski, D., Elfving, B., Müller, H. K., Wegener, G., and Bjarkam, C. R. (2012) Wistar rats subjected to chronic restraint stress display increased hippocampal spine density paralleled by increased expression levels of synaptic scaffolding proteins, *Stress*, **15**, 514-523, doi: 10.3109/10253890.2011.643516.
20. Wagner, K. V., Hartmann, J., Mangold, K., Wang, X. D., Labermaier, C., et al. (2013) Homer1 mediates acute stress-induced cognitive deficits in the dorsal hippocampus, *J. Neuroscience*, **33**, 3857-3864, doi: 10.1523/Jneurosci.4333-12.2013.
21. Buonaguro, E. F., Morley-Fletcher, S., Avagliano, C., Vellucci, L., Iasevoli, F., et al. (2020) Glutamatergic postsynaptic density in early life stress programming: Topographic gene expression of mGlu5 receptors and Homer proteins, *Prog. Neuro Psychoph.*, **96**, 109725, doi: 10.1016/J.Pnpbp.2019.109725.
22. Serchov, T., Heumann, R., van Calker, D., and Biber, K. (2016) Signaling pathways regulating Homer1a expression: implications for antidepressant therapy, *Biol. Chem.*, **397**, 207-214, doi: 10.1515/hsz-2015-0267.
23. Shiraiishi-Yamaguchi, Y., and Furuichi, T. (2007) The Homer family proteins, *Genome Biol.*, **8**, 206, doi: 10.1186/Gb-2007-8-2-206.
24. Flavell, S. W., Kim, T. K., Gray, J. M., Harmin, D. A., Hemberg, M., et al. (2008) Genome-wide analysis of MEF2 transcriptional program reveals synaptic target genes and neuronal activity-dependent polyadenylation site selection, *Neuron*, **60**, 1022-1038, doi: 10.1016/j.neuron.2008.11.029.
25. Irie, K., Nakatsu, T., Mitsuoka, K., Miyazawa, A., Sobue, K., et al. (2002) Crystal structure of the homer 1 family conserved region reveals the interaction between the EVH1 domain and own proline-rich motif, *J. Mol. Biol.*, **318**, 1117-1126, doi: 10.1016/S0022-2836(02)00170-5.
26. Xiao, B., Tu, J. C., Petralia, R. S., Yuan, J. P., Doan, A., et al. (1998) Homer regulates the association of group I metabotropic glutamate receptors with multivalent complexes of Homer-related, synaptic proteins, *Neuron*, **21**, 707-716, doi: 10.1016/S0896-6273(00)80588-7.
27. Bottai, D., Guzowski, J. F., Schwarz, M. K., Kang, S. H., Xiao, B., et al. (2002) Synaptic activity-induced conversion of intronic to exonic sequence in Homer 1 immediate early gene expression, *J. Neuroscience*, **22**, 167-175, doi: 10.1523/Jneurosci.22-01-00167.2002.
28. Shaw, G., and Kamen, R. (2012) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation, *J. Immunol.*, **189**, 5-13.
29. Hermey, G., Mahlke, C., Gutzmann, J. J., Schreiber, J., Bluthgen, N., and Kuhl, D. (2013) Genome-wide profiling of the activity-dependent hippocampal transcriptome, *PLoS One*, **8**, e76903, doi: 10.1371/journal.pone.0076903.
30. Worley, P. F., Zeng, W. Z., Huang, G. J., Kim, J. Y., Shin, D. M., et al. (2007) Homer proteins in Ca<sup>2+</sup> signaling by excitable and non-excitable cells, *Cell Calcium*, **42**, 363-371, doi: 10.1016/j.ceca.2007.05.007.
31. Brakeman, P. R., Lanahan, A. A., O'Brien, R., Roche, K., Barnes, C. A., et al. (1997) Homer: a protein that selectively binds metabotropic glutamate receptors, *Nature*, **386**, 284-288, doi: 10.1038/386284a0.
32. Le Duigou, C., and Kullmann, D. M. (2011) Group I mGluR agonist-evoked long-term potentiation in hippocampal oriens interneurons, *J. Neuroscience*, **31**, 5777-5781, doi: 10.1523/Jneurosci.6265-10.2011.
33. Ronesi, J. A., and Huber, K. M. (2008) Homer interactions are necessary for metabotropic glutamate receptor-induced long-term depression and translational activation, *J. Neuroscience*, **28**, 543-547, doi: 10.1523/Jneurosci.5019-07.2008.
34. Bellone, C., Lüscher, C., and Mameli, M. (2008) Mechanisms of synaptic depression triggered by metabotropic glutamate receptors, *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 2913-2923, doi: 10.1007/s00018-008-8263-3.
35. Lüscher, C., and Huber, K. M. (2010) Group I mGluR-dependent synaptic long-term depression: mechanisms and implications for circuitry and disease, *Neuron*, **65**, 445-459, doi: 10.1016/j.neuron.2010.01.016.
36. Jones, O. D. (2017) Do group I metabotropic glutamate receptors mediate LTD? *Neurobiol. Learn Mem.*, **138**, 85-97, doi: 10.1016/j.nlm.2016.08.010.
37. Saugstad, J. A., and Ingram, S. L. (2008) Group I Metabotropic glutamate receptors (mGlu1 and mGlu5), in *The Glutamate Receptors*, Humana Press, pp. 387-463.
38. Niswender, C. M., and Conn, P. J. (2010) Metabotropic glutamate receptors: physiology, pharmacology, and disease, *Annu. Rev. Pharmacol.*, **50**, 295-322, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.011008.145533.
39. Mao, L. M., Yang, L., Tang, Q. S., Samdani, S., Zhang, G. C., and Wang, J. Q. (2005) The scaffold protein homer1b/c links metabotropic glutamate receptor 5 to extracellular signal-regulated protein kinase cascades in neurons, *J. Neuroscience*, **25**, 2741-2752, doi: 10.1523/Jneurosci.4360-04.2005.
40. Baudry, M., Greget, R., Pernet, F., Bouteiller, J.-M., and Bi, Xi. (2012) Roles of group I metabotropic glutamate receptors under physiological conditions and in neurodegeneration, *WIREs Membr. Transp. Signal.*, **1**, 523-532.
41. Holbro, N., Grunditz, Å., and Oertner, T. G. (2009) Differential distribution of endoplasmic reticulum controls metabotropic signaling and plasticity at hippocampal synapses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 15055-15060, doi: 10.1073/pnas.0905110106.
42. Hayashi, M. K., Tang, C. Y., Verpelli, C., Narayanan, R., Stearns, M. H., et al. (2009) The postsynaptic density proteins homer and shank form a polymeric network structure, *Cell*, **137**, 159-171, doi: 10.1016/j.cell.2009.01.050.
43. Tu, J. C., Xiao, B., Naisbitt, S., Yuan, J. P., Petralia, R. S., et al. (1999) Coupling of mGluR/Homer and PSD-95 complexes by the shank family of postsynaptic density proteins, *Neuron*, **23**, 583-592, doi: 10.1016/S0896-6273(00)80810-7.
44. Sala, C., Roussignol, G., Meldolesi, J., and Fagni, L. (2005) Key role of the postsynaptic density scaffold proteins shank and homer in the functional architecture of Ca<sup>2+</sup> homeostasis at dendritic spines in hippocampal neurons, *J. Neuroscience*, **25**, 4587-4592, doi: 10.1523/Jneurosci.4822-04.2005.
45. Sala, C., Piëch, V., Wilson, N. R., Passafaro, M., Liu, G. S., and Sheng, M. (2001) Regulation of dendritic spine morphology and synaptic function by Shank and Homer, *Neuron*, **31**, 115-130, doi: 10.1016/S0896-6273(01)00339-7.
46. Sala, C., Futai, K., Yamamoto, K., Worley, P. F., Hayashi, Y., and Sheng, M. (2003) Inhibition of dendritic spine morphogenesis and synaptic transmission by activity-inducible protein homer1a, *J. Neuroscience*, **23**, 6327-6337.
47. Ango, F., Prézeau, L., Muller, T., Tu, J. C., Xiao, B., et al. (2001) Agonist-independent activation of metabotropic glutamate receptors by the intracellular protein Homer, *Nature*, **411**, 962-965, doi: 10.1038/35082096.
48. Bertaso, F., Roussignol, G., Worley, P., Bockaert, J., Fagni, L., and Ango, F. (2010) Homer1a-dependent

- crosstalk between NMDA and metabotropic glutamate receptors in mouse neurons, *PLoS One*, **5**, e9755, doi: 10.1371/journal.pone.0009755.
49. Moutin, E., Raynaud, F., Roger, J., Pellegrino, E., Homburger, V., et al. (2012) Dynamic remodeling of scaffold interactions in dendritic spines controls synaptic excitability, *J. Cell Biol.*, **198**, 251-263, doi: 10.1083/jcb.201110101.
  50. Cingolani, L. A., Vitale, C., and Dityatev, A. (2019) Intra- and extracellular pillars of a unifying framework for homeostatic plasticity: a crosstalk between metabotropic receptors and extracellular matrix, *Front. Cell. Neurosci.*, **13**, 513, doi: 10.3389/fncel.2019.00513.
  51. Thomazeau, A., Bosch, M., Essayan-Perez, S., Barnes, S. A., De Jesus-Cortes, H., and Bear, M. F. (2020) Dissociation of functional and structural plasticity of dendritic spines during NMDAR and mGluR-dependent long-term synaptic depression in wild-type and fragile X model mice, *Mol. Psychiatry*, doi: 10.1038/s41380-020-0821-6.
  52. Turrigiano, G. G., and Nelson, S. B. (2004) Homeostatic plasticity in the developing nervous system, *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 97-107, doi: 10.1038/nrn1327.
  53. Celikel, T., Marx, V., Freudenberg, F., Zivkovic, A., Resnik, E., et al. (2007) Select overexpression of Homer1a in dorsal hippocampus impairs spatial working memory, *Front. Neurosci.*, **1**, 97-110, doi: 10.3389/neuro.01.1.1.007.2007.
  54. Rozov, A., Zivkovic, A. R., and Schwarz, M. K. (2012) Homer1 gene products orchestrate Ca(2+)-permeable AMPA receptor distribution and LTP expression, *Front. Synap. Neurosci.*, **4**, 4, doi: 10.3389/fnsyn.2012.00004.
  55. Hennou, S., Kato, A., Schneider, E. M., Lundstrom, K., Gähwiler, B. H., et al. (2003) Homer-1a/Vesl-1S enhances hippocampal synaptic transmission, *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 811-819, doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02812.x.
  56. Holz, A., Mülsch, F., Schwarz, M. K., Hollmann, M., Dobrossy, M. D., et al. (2019) Enhanced mGlu5 signaling in excitatory neurons promotes rapid antidepressant effects via AMPA receptor activation, *Neuron*, **104**, 338-352, doi: 10.1016/j.neuron.2019.07.011.
  57. Diering, G. H., and Huganir, R. L. (2018) The AMPA receptor code of synaptic plasticity, *Neuron*, **100**, 314-329, doi: 10.1016/j.neuron.2018.10.018.
  58. Okada, D., Ozawa, F., and Inokuchi, K. (2009) Input-specific spine entry of soma-derived Vesl-1S protein conforms to synaptic tagging, *Science*, **324**, 904-909, doi: 10.1126/science.1171498.
  59. Clifton, N. E., Cameron, D., Trent, S., Sykes, L. H., Thomas, K. L., and Hall, J. (2017) Hippocampal regulation of postsynaptic density Homer1 by associative learning, *Neural Plast.*, **2017**, 5959182, doi: 10.1155/2017/5959182.
  60. Mahan, A. L., Mou, L. P., Shah, N., Hu, J. H., Worley, P. F., and Ressler, K. J. (2012) Epigenetic modulation of Homer1a transcription regulation in amygdala and hippocampus with pavlovian fear conditioning, *J. Neurosci.*, **32**, 4651-4659, doi: 10.1523/Jneurosci.3308-11.2012.
  61. Qi, C., Roseboom, P. H., Nanda, S. A., Lane, J. C., Speers, J. M., and Kalin, N. H. (2010) Anxiety-related behavioral inhibition in rats: a model to examine mechanisms underlying the risk to develop stress-related psychopathology, *Genes Brain Behav.*, **9**, 974-984, doi: 10.1111/j.1601-183X.2010.00636.x.
  62. Nava, N., Treccani, G., Müller, H. K., Popoli, M., Wegener, G., and Elfving, B. (2017) The expression of plasticity-related genes in an acute model of stress is modulated by chronic desipramine in a time-dependent manner within medial prefrontal cortex, *Eur. Neuropsychopharm.*, **27**, 19-28, doi: 10.1016/j.euroneuro.2016.11.010.
  63. Müller, H. K., Orlowski, D., Bjarkam, C. R., Wegener, G., and Elfving, B. (2015) Potential roles for Homer1 and Spinophilin in the preventive effect of electroconvulsive seizures on stress-induced CA3c dendritic retraction in the hippocampus, *Eur. Neuropsychopharm.*, **25**, 1324-1331, doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.04.011.
  64. Wagner, K. V., Hartmann, J., Labermaier, C., Hausl, A. S., Zhao, G. J., Harbich, D., et al. (2015) Homer1/mGluR5 activity moderates vulnerability to chronic social stress, *Neuropsychopharmacology*, **40**, 1222-1233, doi: 10.1038/npp.2014.308.
  65. Li, M. X., Li, Q., Sun, X. J., Luo, C., Li, Y., et al. (2019) Increased Homer1-mGluR5 mediates chronic stress-induced depressive-like behaviors and glutamatergic dysregulation via activation of PERK-eIF2alpha, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **95**, 109682, doi: 10.1016/j.pnpbp.2019.109682.
  66. Zuo, C. C., Cao, H., Ding, F. F., Zhao, J. L., Huang, Y. Q., et al. (2020) Neuroprotective efficacy of different levels of high-frequency repetitive transcranial magnetic stimulation in mice with CUMS-induced depression: involvement of the p11/BDNF/Homer1a signaling pathway, *J. Psychiatr. Res.*, **125**, 152-163, doi: 10.1016/j.jpsychires.2020.03.018.
  67. Reshetnikov, V. V., Kisaretova, P. E., Ershov, N. I., Merkulova, T. I., and Bondar, N. P. (2020) Social defeat stress in adult mice causes alterations in gene expression, alternative splicing, and the epigenetic landscape of H3K4me3 in the prefrontal cortex: an impact of early-life stress, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **106**, 110068, doi: 10.1016/j.pnpbp.2020.110068.
  68. Orsetti, M., Di Brisco, F., Canonico, P. L., Genazzani, A. A., and Ghi, P. (2008) Gene regulation in the frontal cortex of rats exposed to the chronic mild stress paradigm, an animal model of human depression, *Eur. J. Neurosci.*, **27**, 2156-2164, doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06155.x.
  69. Palmfeldt, J., Henningsen, K., Eriksen, S. A., Müller, H. K., and Wiborg, O. (2016) Protein biomarkers of susceptibility and resilience to stress in a rat model of depression, *Mol. Cell. Neurosci.*, **74**, 87-95, doi: 10.1016/j.mcn.2016.04.001.
  70. Burns, S. B., Almeida, D., and Turecki, G. (2018) The epigenetics of early life adversity: current limitations and possible solutions, *Prog. Mol. Biol. Transl.*, **157**, 343-425, doi: 10.1016/bs.pmbts.2018.01.008.
  71. Turecki, G., Ota, V. K., Belanger, S. I., Jackowski, A., and Kaufman, J. (2014) Early life adversity, genomic plasticity, and psychopathology, *Lancet Psychiatr.*, **1**, 461-466, doi: 10.1016/S2215-0366(14)00022-4.
  72. Montes-Rodriguez, C. J., Lapointe, V., Trivedi, V., Lu, Q., Demchuk, A. M., and McNaughton, B. L. (2013) Postnatal development of Homer1a in the rat hippocampus, *Hippocampus*, **23**, 890-902, doi: 10.1002/hipo.22146.
  73. Ary, A. W., Aguilar, V. R., Szumlanski, K. K., and Kippin, T. E. (2007) Prenatal stress alters limbo-corticostriatal Homer protein expression, *Synapse*, **61**, 938-941, doi: 10.1002/syn.20439.
  74. Ryabushkina, Y. A., Reshetnikov, V. V., and Bondar, N. P. (2020) Maternal Separation early in life alters the expression of genes *Npas4* and *Nr1d1* in adult female mice: correlation with social behavior, *Behav. Neurol.*, **2020**, 7830469, doi: 10.1155/2020/7830469.
  75. Ji, Y., Lu, Y., Yang, F., Shen, W., Tang, T. T., et al. (2010) Acute and gradual increases in BDNF concentration elicit distinct signaling and functions in neurons, *Nat. Neurosci.*, **13**, 302-309, doi: 10.1038/nn.2505.
  76. Bondar, N. P., and Merkulova, T. I. (2016) Brain-derived neurotrophic factor and early-life stress: multifaceted



- interplay, *J. Biosciences*, **41**, 751-758, doi: 10.1007/s12038-016-9648-3.
77. Roth, T. L., and Sweatt, J. D. (2011) Epigenetic marking of the BDNF gene by early-life adverse experiences, *Horm. Behav.*, **59**, 315-320, doi: 10.1016/j.yhbeh.2010.05.005.
  78. Rietschel, M., Mattheisen, M., Frank, J., Treutlein, J., Degenhardt, F., et al. (2010) Genome-wide association-, replication-, and neuroimaging study implicates HOMER1 in the etiology of major depression, *Biol. Psychiat.*, **68**, 578-585, doi: 10.1016/j.biopsych.2010.05.038.
  79. Rao, S. T., Leung, C. S. T., Lam, M. H., Wing, Y. K., Waye, M. M. Y., and Tsui, S. K. W. (2017) Resequencing three candidate genes discovers seven potentially deleterious variants susceptibility to major depressive disorder and suicide attempts in Chinese, *Gene*, **603**, 34-41, doi: 10.1016/j.gene.2016.12.006.
  80. Strauss, J., McGregor, S., Freeman, N., Tiwari, A., George, C. J., et al. (2012) Association study of early-immature genes in childhood-onset mood disorders and suicide attempt, *Psychiatry Res.*, **197**, 49-54, doi: 10.1016/j.psychres.2011.11.022.
  81. Rao, S. T., Lam, M. H. B., Yeung, V. S. Y., Wing, Y. K., and Waye, M. M. Y. (2016) Association of HOMER1 rs2290639 with suicide attempts in Hong Kong Chinese and the potentially functional role of this polymorphism, *Springerplus*, **5**, 767, doi: 10.1186/S40064-016-2404-1.
  82. Benedetti, F., Poletti, S., Locatelli, C., Mazza, E., Lorenzi, C., et al. (2018) A Homer 1 gene variant influences brain structure and function, lithium effects on white matter, and antidepressant response in bipolar disorder: a multimodal genetic imaging study, *Prog. Neuro Psychoph.*, **81**, 88-95, doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.10.011.
  83. Wells, T. T., Judah, M. R., Ellis, A. J., McGeary, J. E., and Beevers, C. G. (2015) Inhibition of attention for affective material: contributions by HOMER1 gene variation, *Psychol. Neurosci.*, **8**, 495-508, doi: 10.1037/pne0000027.
  84. Antontseva, E., Bondar, N., Reshetnikov, V., and Merkulova, T. (2020) The effects of chronic stress on brain myelination in humans and in various rodent models, *Neuroscience*, **441**, 226-238, doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.06.013.
  85. Leber, S. L., Llenos, I. C., Miller, C. L., Dulay, J. R., Haybaeck, J., and Weis, S. (2017) Homer1a protein expression in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression, *J. Neural Transm.*, **124**, 1261-1273, doi: 10.1007/s00702-017-1776-x.
  86. Bernard, R., Kerman, I. A., Thompson, R. C., Jones, E. G., Bunney, W. E., et al. (2011) Altered expression of glutamate signaling, growth factor, and glia genes in the locus coeruleus of patients with major depression, *Mol. Psychiatry*, **16**, 634-646, doi: 10.1038/mp.2010.44.
  87. Ising, M., Lucae, S., Binder, E. B., Bettecken, T., Uhr, M., et al. (2009) A genomewide association study points to multiple loci that predict antidepressant drug treatment outcome in depression, *Arch. Gen. Psychiatry*, **66**, 966-975, doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2009.95.
  88. Szumlinski, K. K., Kalivas, P. W., and Worley, P. F. (2006) Homer proteins: implications for neuropsychiatric disorders, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **16**, 251-257, doi: 10.1016/j.conb.2006.05.002.
  89. Sun, P., Wang, F. R., Wang, L., Zhang, Y., Yamamoto, R., et al. (2011) Increase in cortical pyramidal cell excitability accompanies depression-like behavior in mice: a transcranial magnetic stimulation study, *J. Neurosci.*, **31**, 16464-16472, doi: 10.1523/Jneurosci.1542-11.2011.
  90. Sun, P., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, F. R., Chen, R., et al. (2015) Homer1a-dependent recovery from depression-like behavior by photic stimulation in mice, *Physiol. Behav.*, **147**, 334-341, doi: 10.1016/j.physbeh.2015.05.007.
  91. Conti, B., Maier, R., Barr, A. M., Morale, M. C., Lu, X., et al. (2007) Region-specific transcriptional changes following the three antidepressant treatments electroconvulsive therapy, sleep deprivation and fluoxetine, *Mol. Psychiatry*, **12**, 167-189, doi: 10.1038/sj.mp.4001897.
  92. Szumlinski, K. K., Lominac, K. D., Kleschen, M. J., Oleson, E. B., Dehoff, M. H., et al. (2005) Behavioral and neurochemical phenotyping of Homer1 mutant mice: possible relevance to schizophrenia, *Genes Brain Behav.*, **4**, 273-288, doi: 10.1111/j.1601-183X.2005.00120.x.
  93. Lominac, K. D., Oleson, E. B., Pava, M., Klugmann, M., Schwarz, M. K., et al. (2005) Distinct roles for different Homer1 isoforms in behaviors and associated prefrontal cortex function, *J. Neurosci.*, **25**, 11586-11594, doi: 10.1523/Jneurosci.3764-05.2005.
  94. Serchov, T., Schwarz, I., Theiss, A., Sun, L., Holz, A., et al. (2020) Enhanced adenosine A1 receptor and Homer1a expression in hippocampus modulates the resilience to stress-induced depression-like behavior, *Neuropharmacology*, **162**, 107834, doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.107834.
  95. Albert, P. R. (2019) Targeting Homer1a for rapid antidepressant effects, *Neuron*, **104**, 182-183, doi: 10.1016/j.neuron.2019.10.003.
  96. Treccani, G., Musazzi, L., Perego, C., Milanese, M., Nava, N., et al. (2014) Stress and corticosterone increase the readily releasable pool of glutamate vesicles in synaptic terminals of prefrontal and frontal cortex, *Mol. Psychiatry*, **19**, 433-443, doi: 10.1038/mp.2014.5.
  97. Musazzi, L., Tornese, P., Sala, N., and Popoli, M. (2017) Acute stress is not acute: sustained enhancement of glutamate release after acute stress involves readily releasable pool size and synapsin I activation, *Mol. Psychiatry*, **22**, 1226-1227, doi: 10.1038/mp.2016.175.
  98. Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B. S., and Sanacora, G. (2012) The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission, *Nat. Rev. Neurosci.*, **13**, 22-37, doi: 10.1038/nrn3138.
  99. Joëls, M., and Baram, T. Z. (2009) The neuro-symphony of stress, *Nat. Rev. Neurosci.*, **10**, 459-466, doi: 10.1038/nrn2632.
  100. Inoue, Y., Udo, H., Inokuchi, K., and Sugiyama, H. (2007) Homer1a regulates the activity-induced remodeling of synaptic structures in cultured hippocampal neurons, *Neuroscience*, **150**, 841-852, doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.081.
  101. Wang, Y., Rao, W., Zhang, C., Zhang, C., Liu, M. D., et al. (2015) Scaffolding protein Homer1a protects against NMDA-induced neuronal injury, *Cell Death Dis.*, **6**, e1843, doi: 10.1038/cddis.2015.216.
  102. Wang, Y., Zhao, M. M., Shang, L., Zhang, Y. G., Huang, C. G., et al. (2020) Homer1a protects against neuronal injury via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway, *Int. J. Neurosci.*, **130**, 621-630, doi: 10.1080/00207454.2019.1702535.
  103. Fei, F., Rao, W., Zhang, L., Chen, B. G., Li, J., et al. (2014) Downregulation of Homer1b/C improves neuronal survival after traumatic neuronal injury, *Neuroscience*, **267**, 187-194, doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.02.037.
  104. Diering, G. H., Nirujogi, R. S., Roth, R. H., Worley, P. F., Pandey, A., and Huganir, R. L. (2017) Homer1a drives homeostatic scaling-down of excitatory synapses during sleep, *Science*, **355**, 511-515, doi: 10.1126/science.aai8355.
  105. Chen, F. H., Polsinelli, B., Nava, N., Treccani, G., Elfving, B., et al. (2020) Structural plasticity and molecular markers in hippocampus of male rats after acute stress, *Neuroscience*, **438**, 100-115, doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.05.001.

## THE ROLE OF STRESS-INDUCED CHANGES IN THE EXPRESSION OF HOMER1 IN STRESS SUSCEPTIBILITY

### Review

V. V. Reshetnikov<sup>1,2\*</sup> and N. P. Bondar<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: vasilyreshetnikov@bionet.nsc.ru*

<sup>2</sup> *Sirius University of Science and Technology, 354340 Sochi, Russia*

<sup>3</sup> *Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia*

Stress negatively affects processes of synaptic plasticity and is a major risk factor of various psychopathologies such as depression and anxiety. HOMER1 is an important component of the postsynaptic density: constitutively expressed long isoforms HOMER1b and HOMER1c bind to group I metabotropic glutamate receptors MGLUR1 (GRM1) and MGLUR5 and to other effector proteins, thereby forming a postsynaptic protein scaffold. Activation of the GLUR1–HOMER1b,c and/or GLUR5–HOMER1b,c complex regulates activity of the NMDA and AMPA receptors and Ca<sup>2+</sup> homeostasis, thus modulating various types of synaptic plasticity. Dominant negative transcript *Homer1a* is formed as a result of activity-induced alternative termination of transcription. Expression of this truncated isoform in response to neuronal activation impairs interactions of HOMER1b,c with adaptor proteins, triggers ligand-independent signal transduction through MGLUR1 and/or MGLUR5, leads to suppression of the AMPA- and NMDA-mediated signal transmission, and thereby launches remodeling of the postsynaptic protein scaffold and inhibits long-term potentiation. The studies on animal models confirm that the HOMER1a-dependent remodeling most likely plays an important part in the stress susceptibility, whereas HOMER1a itself can be regarded as a neuroprotector. In this review article, we consider the effects of different stressors in various animal models on HOMER1 expression as well as impact of different HOMER1 variants on human behavior as well as structural and functional characteristics of the brain.

*Keywords:* stress, depression, synaptic plasticity, Homer1, metabotropic glutamate receptors

УДК 543.51

## БЕЛОК DJ-1 И ЕГО РОЛЬ В РАЗВИТИИ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА: ИССЛЕДОВАНИЯ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ

### Обзор

© 2021 О.А. Бунеева, А.Е. Медведев\*

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

Поступила в редакцию 25.12.2020

После доработки 25.02.2021

Принята к публикации 12.03.2021

DJ-1, известный также как белок 7 болезни Паркинсона (БП) (Parkinson disease protein 7), – многофункциональный белок, который экспрессируется практически во всех клетках и тканях. Взаимодействуя с белками различных внутриклеточных компартментов, DJ-1 играет важную роль в поддержании ряда клеточных функций. У мутантных форм DJ-1, содержащих аминокислотные замены (особенно L166P, характерные для БП), нарушены способность этого белка к димеризации, стабильность и фолдинг. DJ-1 проявляет несколько видов каталитической активности, однако в классификации ферментов он фигурирует как протеиндегликаза (КФ 3.5.1.124). По-видимому, в разных компартментах клетки DJ-1-белку свойственны каталитические и некаталитические функции, соотношение которых пока неизвестно. Оксидативный стресс способствует диссоциации цитоплазматических димеров DJ-1 и увеличенному поступлению образовавшихся мономеров в ядро, где этот белок действует как коактиватор различных сигнальных путей, предотвращая гибель клеток. В митохондриях DJ-1 обнаружен в составе синтасом, где он взаимодействует с  $\beta$ -субъединицей АТФ-синтазы. При моделировании экспериментального паркинсонизма подавление экспрессии гена *DJ-1* повышает чувствительность клеток к нейротоксинам, а введение рекомбинантного белка DJ-1 ослабляет проявление этой патологии. Тринадцатичленный фрагмент аминокислотной последовательности DJ-1, присоединённый к проникающему в клетки гептапептиду ТАТ-белка, проявлял нейропротекторные свойства в различных вариантах моделирования паркинсонизма как на культурах клеток, так и при введении животным. Низкомолекулярные лиганды DJ-1 также обладают терапевтическим потенциалом, оказывая нейропротекторный эффект как при инкубации с клетками, так и при введении животным.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** белок DJ-1, структура и функции, каталитическая активность, патогенные мутации, болезнь Паркинсона, экспериментальные модели, лиганды DJ-1.

**DOI:** 10.31857/S0320972521060026

### ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – прогрессирующее нейродегенеративное расстройство, которое характеризуется относительно избирательной потерей дофаминергических нейронов и присутствием телец Леви в чёрной субстанции [1]. В большинстве случаев преобладают спорадические формы БП, на долю БП с ранним началом приходится от 5 до 10 процентов всех случаев [2]. Аутосомно-рецессивные фор-

мы БП с ранним началом вызваны мутациями в генах *Parkin* (*PARK2*), *PINK1* (*PARK6*), *DJ-1* (*PARK7*) и *ATP13A2* (*PARK9*) [2]. Открытие мутаций, вызывающих наследственные формы БП, сделало поистине революционный прорыв в изучении механизмов развития БП [2, 3], которая в течение длительного времени рассматривалась как нейродегенеративное заболевание, не связанное с наследственностью.

Белок DJ-1, фигурирующий в базе данных UniProt под названием Parkinson disease protein 7 (код доступа Q99497), был открыт в 1997 г., как продукт онкогена, вовлечённый в сигнальный путь Ras/MAP-киназа [4]. В 2003 г. было обнаружено, что кодирующий его ген *DJ-1* (также известный как *PARK7*, что обозначает связь с БП и хронологический порядок идентификации [5]) ассоциирован с довольно редкой аутосомно-рецессивной формой болезни Паркинсона с ранним началом [6, 7]. Позднее выявлены изменения экспрессии этого гена в различных

Принятые сокращения: БП – болезнь Паркинсона; МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; МФП<sup>+</sup> – ион 1-метил-4-фенилпиридиния; MAO – моноаминоксидаза; HIF-1 $\alpha$  – индуцируемый гипоксией транскрипционный фактор 1 (Hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$ ); Nrf2 – ядерный транскрипционный фактор (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2); SOD – супероксиддисмутаза; TRAF6 – фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей (TNF receptor-associated factor 6).

\* Адресат для корреспонденции.

отделах мозга пациентов с распространёнными формами БП [7].

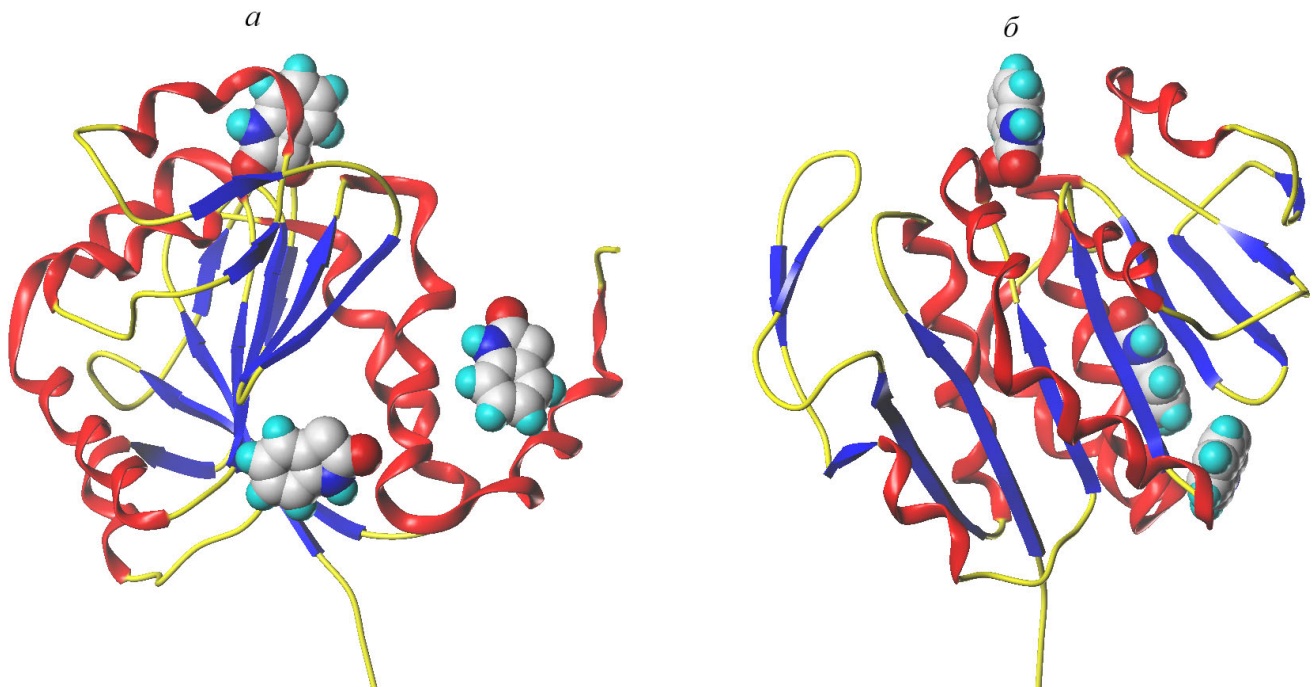
Интерес к DJ-1 настолько велик, что, как иронично заметил видный специалист в области изучения БП Марк Куксон, число исследователей этого белка намного превышает число больных с данной наследственной формой паркинсонизма, обусловленной мутацией гена *PARK7* [8]. Это связано с тем, что в клетке DJ-1 может взаимодействовать со многими белками-партнёрами, а обнаруженные мутации в гене *DJ-1* приводят к изменению структуры и функции кодируемого им белка, что способствует пониманию как молекулярных механизмов развития определенных форм БП, так и общебиологической роли этого белка в организме. Немаловажную роль играет и тот факт, что современный молекулярно-биологический инструментарий позволяет «дирижировать» различными формами DJ-1 и моделировать патофизиологические состояния как на уровне клеток, так и целых экспериментальных организмов.

#### СТРУКТУРА И ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫЕ МОДИФИКАЦИИ БЕЛКА DJ-1

DJ-1 – высококонсервативный белок, состоящий из 189 аминокислотных остатков, кото-

рый содержит 9 альфа-спиралей и 7 бета-складчатых структур [9] (рис. 1). *In vivo* он существует в виде димера, а у мутантных форм белка, содержащих характерные для БП аминокислотные замены, нарушена способность к димеризации, стабильность и фолдинг [10]. Наиболее разрушительной в этом плане оказывается аминокислотная замена L166P, которая нарушает пространственную структуру белка и образование гомодимеров [11]. Другие ассоциированные с БП мутации (E64D, A104T, D149A, E163K и M26I) такого повреждающего действия на фолдинг и димеризацию белка DJ-1 не оказывают, но снижают термостабильность в растворе [12, 13].

DJ-1 содержит три остатка цистеина (C46, C56 и C106), среди которых наиболее функционально важным является C106. Именно этот остаток цистеина наиболее восприимчив к окислительному стрессу; в ходе окисления его SH-группа последовательно превращается в сульфеновую (SOH), сульфиновую (SO<sub>2</sub>H) и далее в сульфоновую (SO<sub>3</sub>H) кислоты. Замена остатка цистеина C106A предупреждала образование окисленной формы белка DJ-1, в то время как аналогичные аминокислотные замены других остатков цистеина (C46A или C53A) такого действия не оказывали [14]. Мутация именно остатка цистеина C106A предупреждала транслокацию белка DJ-1 в митохондрии [14]. Окис-



**Рис. 1.** Пространственная структура белка DJ-1 со связанными молекулами изатина (изображены сферами). Взята из базы данных PDB (ID: 6AF9); внесена в базу данных авторами: Saaveiro, J. M. M., Tashiro, S., Tsumoto, K. (дата внесения 08.08.2018); *a, б* – две ортогональные проекции. (С цветными вариантами рисунков можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

ление S106 оказывает минимальное влияние на структуру белка DJ-1, но именно эта форма оказывала ингибиторное действие на агрегацию  $\alpha$ -синуклеина. Более глубокое окисление белка DJ-1 сопровождалось нарушениями вторичной структуры и потерей способности ингибировать образование  $\alpha$ -синуклеиновых фибрилл [15]. Исследование уровня окисленного белка DJ-1 в областях мозга, имеющих отношение к развитию БП, не выявило статистически значимых различий между молодыми (9 недель) и старыми (130 недель) мышами [16]. Исключение составил только стриатум, где соотношение окисленного и неокисленного белка DJ-1 было выше у молодых животных.

Помимо окисления остатков цистеина важную роль для биологической активности DJ-1 играет сумоилирование — присоединение небольших убиквитин-подобных белков (small ubiquitin-like modifiers, SUMO) [17, 18]. Функционально компетентный белок (дикого типа) DJ-1 подвергается сумоилированию в клетках по остатку лизина (K130); при мутации K130R этот процесс нарушался, а мутантный белок DJ-1 становился функционально неактивным. В случае мутации, ассоциированной с развитием БП (L166P), сумоилирование происходило по другим остаткам лизина с формированием неправильно свёрнутых нерастворимых форм белка [17].

DJ-1 также подвергается убиквитинированию. Это способствует деградации в протеасомах мутантного белка DJ-1, содержащего аминокислотную замену L166P, обнаруженную у больных с БП [17].

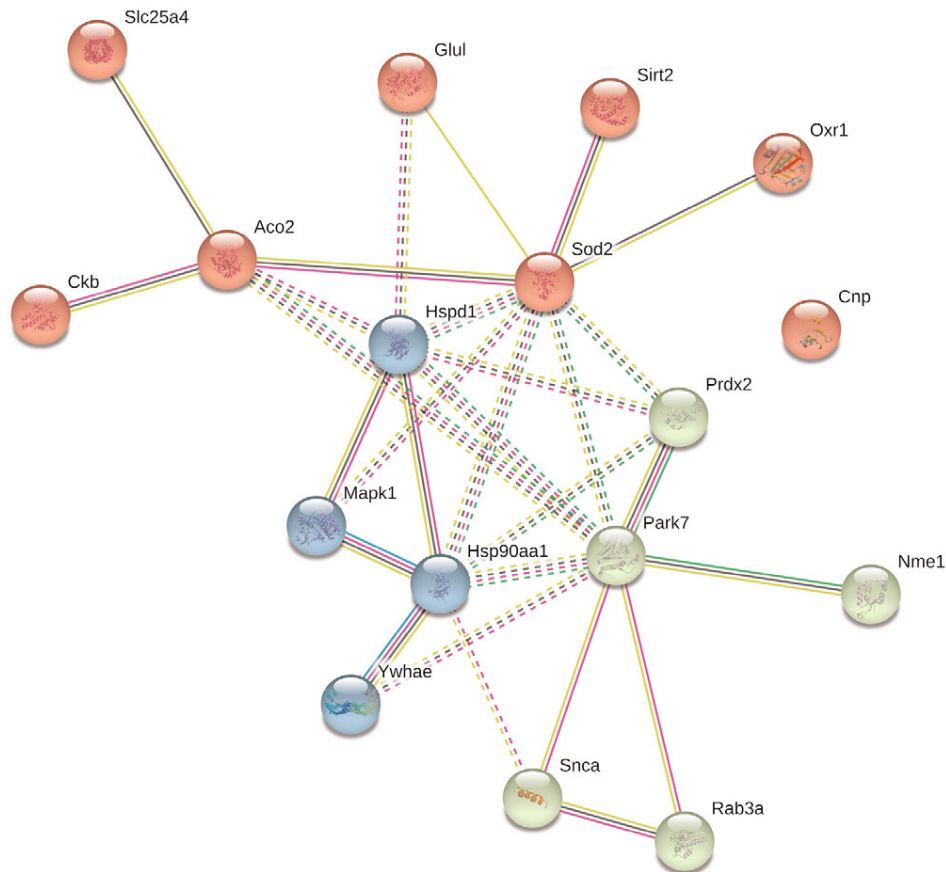
В клетках нейробластомы и в лизатах мозга человека белок DJ-1 формирует комплекс с паркином и PINK1 (мутации каждого из этих трех белков приводят к БП, наследуемой по аутосомно-рецессивному типу) [19]. Этот комплекс обладает убиквитинлигазной активностью и способен убиквитинировать субстраты паркина (например, синфилин-1) и сам паркин. Генетическое устранение DJ-1 либо PINK1 приводит к снижению уровня убиквитинирования самого паркина и его субстратов и накоплению aberrантных белков. Такой же эффект наблюдается и в случае мутантных (паркинсонических) форм PINK1 и паркина [19]. В клетках нейробластомы человека SH-SY5Y DJ-1 взаимодействует с другой E3-убиквитинлигазой — опухолевым супрессором, белком VHL (Von Hippel Lindau). Это приводит к нарушению взаимодействия VHL с альфа-субъединицей гетеродимерного индуцируемого гипоксией транскрипционного фактора 1 (HIF-1 $\alpha$ ) и препятствует убиквитинированию HIF-1 $\alpha$ . Дефицит DJ-1 приводит к

снижению уровня HIF-1 $\alpha$  при гипоксии и окислительном стрессе. Лимфоциты пациентов с БП, связанной с мутациями DJ-1, характеризуются менее стабильным HIF-1 $\alpha$  по сравнению с таковым у здоровых людей. Это позволяет заключить, что DJ-1 защищает нейроны от гибели путём ингибирования убиквитинлигазной активности VHL [20].

E3-Убиквитинлигаза TRAF6 (фактор 6, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей), помимо неправильно свёрнутого мутантного DJ-1, убиквитинирует и мутантный  $\alpha$ -синуклеин — основной компонент телец Леви [21–22]. Интересно, что TRAF6 осуществляет атипичное полиубиквитинирование DJ-1 и  $\alpha$ -синуклеина за счёт лизиновых остатков K6, K27 и K29 молекулы убиквитина. Это способствует накоплению нерастворимых агрегатов полиубиквитинированных DJ-1 и  $\alpha$ -синуклеина в цитоплазме. В аутопсийных препаратах мозга пациентов с БП белок TRAF6 локализован совместно с DJ-1 и  $\alpha$ -синуклеином. Известно, что полиубиквитинирование с участием остатков K48 осуществляется, как правило, для меченых белков с целью последующей протеасомной деградации [23], в то время как атипичное полиубиквитинирование преимущественно играет роль в аутофагии, формировании различных сигнальных путей, репарации ДНК и регуляции иммунного ответа [24–26].

DJ-1 может служить регулятором 20S-протеасомы. Связываясь с протеасомой, DJ-1 ингибирует её активность, защищая частично развёрнутые белки от деградации [27]. Это позволяет поддерживать определенный уровень в клетке ряда важных белков-субстратов 20S-протеасомы (например,  $\alpha$ -синуклеина и p53). При окислительном стрессе DJ-1, напротив, активирует 20S-протеасому с помощью Nrf2-зависимого сигнального пути (ядерный транскрипционный фактор 2; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), способствуя быстрому удалению повреждённых белков из клетки [27].

В контексте функционирования убиквитин-протеасомной системы убиквитинирование DJ-1 может, очевидно, играть и регуляторную роль. Во всяком случае недавно проведённый анализ митохондриального убиквитилома мозга мышцей [28] показал, что сетевое взаимодействие убиквитинированных белков формируется тремя функциональными горизонтальными слоями, связь между которыми осуществляется белками DJ-1, супероксиддисмутазой 2 (SOD2) и белком теплового шока Hsp90 $\alpha$  (кодируемыми генами *Park7*, *Hsp90aa1* и *Sod2* соответственно) (рис. 2). И хотя прямое взаимодействие между этими белками не было исследовано, ряд



**Рис. 2.** Сетевой анализ взаимодействия убиквитинированных белков митохондрий мозга мышей [28]. Объяснения приведены в тексте. Воспроизведено с разрешения Pleiades Publishing

косвенных данных указывает на существование такого рода функциональных взаимосвязей [29]. Все это свидетельствует о том, что в митохондриях мозга белок DJ-1 вовлечён в межмолекулярные взаимодействия, которые связаны с защитными механизмами от окислительного стресса, включающими процессы убиквитинирования митохондриальных белков. В контексте прямого взаимодействия DJ-1 с антиоксидантными белками следует отметить, что в его структуре выявлен участок связывания ионов меди, включающий остаток С106 [30]. В модельных экспериментах этот участок играл важную роль в переносе иона меди между DJ-1 и цитозольной супероксиддисмутазой 1 (SOD1) [30]. В мотонейронах трансгенных мышей *SOD1<sup>G93A</sup>* показано прямое взаимодействие DJ-1 с мутантной SOD1, которое способствовало снижению проявлений окислительного стресса [31].

Среди других видов посттрансляционных модификаций следует отметить недавно обнаруженное прямое фосфорилирование DJ-1 протеинкиназой А (PKA) [32]. Связывание DJ-1 с ка-

талитической субъединицей (PKA $\alpha$ ) приводило к фосфорилированию по остатку T154. Аминокислотная замена T154A нарушала стабильность мутанта, димеризацию и способствовала его деградации в протеасомах. В клетках *PRAK<sup>+/+</sup>*, экспрессирующих киназу PRAK (p38 regulated/activated kinase), фосфорилирование DJ-1 происходило после воздействия 0,3 мМ пероксидом водорода [33]. В клетках без этой киназы (*PRAK<sup>-/-</sup>*) фосфорилирование DJ-1 обнаружено не было. Поскольку фосфорилирование было выявлено при помощи антител, специфичных к фосфосерину, конкретный модифицированный аминокислотный остаток не был идентифицирован.

Анализ протеоформ белка DJ-1 в клетках карциномы молочной железы MCF-7, проведённый с помощью tandemной масс-спектрометрии [34], позволил выявить ещё один сайт фосфорилирования – T125, имеющий отношение к регуляции каталитических функций этого белка. Однако фермент, осуществляющий фосфорилирование DJ-1, пока не выявлен.

### КАТАЛИТИЧЕСКИЕ ФУНКЦИИ БЕЛКА DJ-1

На сегодняшний день DJ-1 фигурирует в классификации ферментов как протеиндегликаза (КФ 3.5.1.124), катализирующая реакцию дегликирования остатков аргинина, лизина и цистеина в белках:

- (1)  $N^{\omega}$ -(1-hydroxy-2-oxopropyl)-[protein]-L-Arg +  $H_2O$  = [protein]-L-Arg + (R)-lactate,
- (2)  $N^{\epsilon}$ -(1-hydroxy-2-oxopropyl)-[protein]-L-Lys +  $H_2O$  = [protein]-L-Lys + (R)-lactate,
- (3)  $S$ -(1-hydroxy-2-oxopropyl)-[protein]-L-Cys +  $H_2O$  = [protein]-L-Cys + (R)-lactate.

В модельных системах DJ-1 восстанавливал гликированные аминокислоты N-ацетилцистеин, N-ацетиларгинин и N-ацетилизин, предварительно модифицированные в реакции с метилглиоксалем (MGO) [35]. Дегликазная активность белка DJ-1 была подтверждена в экспериментах с гликированными белками (бычьим сывороточным альбумином, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой, фруктозо-1,6-бисфосфатальдозазой, аспартатаминотрансферазой). Для дегликазной активности необходим интактный остаток C106: мутантный DJ-1-белок с аминокислотной заменой C106S был неактивен в реакции дегликирования N-ацетилцистеина, а активность мутантных белков с аминокислотными заменами C53S и C46S была сопоставима с активностью DJ-1 дикого типа [35]. DJ-1 также катализировал реакцию дегликирования предварительно MGO-гликированного  $\alpha$ -синуклеина; мутантная форма этого белка, содержащая ассоциированную с БП аминокислотную замену (L166P), была менее активна и проявляла меньшее сродство к  $\alpha$ -синуклеину [36]. Помимо дегликирования белков, DJ-1 предотвращал гликирование нуклеиновых кислот [37].

Дегликазная активность белка DJ-1 может объяснить ряд других ранее описанных активностей этого белка. Действуя как дегликаза, DJ-1 может выступать в качестве шаперона, взаимодействующего с гликированными белками глиоксалазы 1, осуществляющей и превращения гемитиоацеталей в тиоэфиры, и аминокарбинолов в амиды глиоксалазы 2, осуществляющей расщепления тиоэфиров в ходе дегликирования цистеина, а также протеазы, расщепляющей амидные связи при дегликировании лизина/аргинина [35]. Правда, для всех этих активностей необходим неокисленный остаток цистеина C106 [35]. С учётом того, что мягкое окисление SH-группы C106 до сульфеновой кислоты фактически служит сигналом для транслокации DJ-1 в митохондрии [14, 18], всю многофункциональность этого белка вряд ли можно связать

только с его каталитическими функциями. По-видимому, в разных компартментах клетки белку DJ-1 свойственны каталитические и некаталитические функции, соотношение которых нуждается в дальнейших исследованиях.

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ DJ-1 С БЕЛКАМИ МИТОХОНДРИЙ И ЯДРА

Белок DJ-1 преимущественно определяется в цитоплазме и при развитии оксидативного стресса транслоцируется в митохондрии и ядро. Важным для процесса транслокации DJ-1 в митохондрии является окисление SH-группы C106 до сульфеновой кислоты [14, 18].

Прямое взаимодействие DJ-1 с субъединицами NADH-дегидрогеназы митохондрий играет важную роль в поддержании функциональной активности комплекса I.

На клетках, экспрессирующих FLAG-меченую субъединицу митохондриальной NADH-дегидрогеназы NDUF4, показано прямое связывание DJ-1 с субъединицами комплекса I, кодируемыми как ядерной ДНК (NDUF4), так и митохондриальной (ND1) [38]. В условиях окислительного стресса, индуцированного 0,2 mM  $H_2O_2$ , FLAG-меченая субъединица NDUF4 была связана как с восстановленной, так и с окисленной формами DJ-1. Окислительный стресс способствовал ассоциации эндогенного DJ-1 и с другими субъединицами комплекса I (ND1). Нокаун гена *DJ-1* в клетках NIH3T3 и HEK293 при помощи малой интерферирующей РНК (siRNA) приводил к снижению активности комплекса I. Мутантный белок DJ-1, несущий аминокислотную замену L166P, обнаруженную у пациентов с БП [5], также связывался с NDUF4, но в отличие от белка дикого типа не влиял на активность комплекса I. Это свидетельствует о том, что DJ-1 участвует в регуляции активности комплекса I. В то же время нокаут гена *DJ-1* у так называемых *Polg*-мутаторных мышей (у которых полимераза- $\gamma$ , ответственная за репликацию митохондриального генома, лишена 3'-5'-экзонуклеазной активности, необходимой для исправления ошибок репликации [39]) не оказывал существенного влияния на нигростриатные пути [40].

DJ-1 обнаружен в составе субмитохондриальных везикул (синтасом), где взаимодействует с  $\beta$ -субъединицей АТФ-синтазы, снижая таким образом утечку протонов и повышая продукцию АТФ [41]. Мутантные DJ-1-белки, содержащие аминокислотные замены, связанные с болезнью Паркинсона (A104T, D149A и L166P), и DJ-1, лишённые C-концевого 60-членного пептида,

также взаимодействовали с  $\beta$ -субъединицей АТФ-синтазы, но не снижали утечку протонов (и не повышали синтез АТФ). Выключение гена *DJ-1* в клетках среднего мозга приводило практически к двукратному падению уровня АТФ и снижало рост и число нейритов дофаминергических нейронов. Поскольку отсутствие *DJ-1* лишь частично компенсировалось добавлением декспрампексола (dexpramipexole) — препарата, способного блокировать утечку протонов через внутреннюю мембрану, — регуляторные эффекты *DJ-1*, очевидно, не ограничиваются только взаимодействием этого белка с АТФ-синтазой [41]. Митохондрии, дефектные по *DJ-1*, характеризуются повышенным уровнем дыхания в метаболическом состоянии 4, что также свидетельствует в пользу важной роли *DJ-1* в функциональной целостности внутренней мембраны [42]. По данным электронной микроскопии [43], форма митохондрий клеток М17 нейроblastомы человека, экспрессирующих *DJ-1* дикого типа, существенно отличалась от аналогичных клеток, экспрессирующих мутантные формы этого белка, содержащие аминокислотные замены R98Q, D149A и L166P. В мутантных клетках уровень фрагментации митохондрий был существенно повышен [43]. Все эти данные свидетельствуют о важной роли белка *DJ-1* в митохондриях.

Экспрессируемый эндогенно белок *DJ-1* поступает из цитоплазмы в ядро в виде мономера, и этот процесс существенно увеличивается в ответ на оксидативный стресс клеток, индуцированный пероксидом водорода [44]. Оксидативный стресс способствует диссоциации цитоплазматических димеров *DJ-1* и увеличенному поступлению образовавшихся мономеров в ядро. Сигналом ядерной локализации, по-видимому, служит пролин-тирозиновый дипептидный фрагмент белка *DJ-1*, узнаваемый белком кариоферин-бета2 [45]. Кариоферин-бета2 образовывал комплексы как с белком *DJ-1* дикого типа, так и с мутантными формами, содержащими аминокислотные замены С106А, А104Т, D149А, но не E163K. Это говорит в пользу того, что редокс-статус С106 вряд ли имеет существенное значение для транспорта *DJ-1* [44].

Помимо каталитической функции (дегликирования гистонов), которая повышается при фосфорилировании T125 [34], в ядре *DJ-1* может взаимодействовать и осуществлять секвестрацию белка Daхх, что способствует предотвращению гибели клеток [46].

Он также действует как коактиватор различных сигнальных путей, в том числе андрогенового рецептора [47, 48], Nrf2 [49], белка p53 [50, 51]. *DJ-1* является нейропротекторным тран-

скрипционным коактиватором, который связывается с промотором гена тирозингидроксилазы (ТН), в конечном итоге регулируя выработку дофамина [52, 53].

В таблице обобщены примеры взаимодействия *DJ-1* со своими белками-партнёрами.

## БЕЛОК DJ-1 В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА

**МФТП-индуцированный паркинсонизм.** Среди экспериментальных моделей паркинсонизма одной из наиболее популярных является паркинсонизм, индуцируемый поступлением в организм 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) [1, 8, 70, 71]. Этот протоксин подвергается метаболическому превращению при участии моноаминоксидазы типа Б (МАО Б), которая при этом инактивируется. Образующийся нейротоксин МФТП<sup>+</sup> (ион 1-метил-4-фенилпиридиния) ингибирует комплекс I дыхательной цепи, приводя в конечном итоге к развитию симптомокомплекса, характерного для этого заболевания. Введение ингибиторов МАО Б (например, депренила или изатина [72–74]), препятствующих метаболической активации МФТП, предупреждает развитие дефицита нейромедиатора дофамина и двигательных нарушений, свойственных болезни Паркинсона.

Через две недели после введения мышам суммарной дозы МФТП 80 мг/кг (4 инъекции по 20 мг/кг с интервалом в 2 ч) в чёрной субстанции отмечено двукратное снижение числа дофаминергических нейронов, оцениваемых по иммуноокрашиванию на тирозингидроксилазу — ключевой фермент биосинтеза дофамина. При этом число пролиферирующих (BrdU<sup>+</sup>-позитивных) клеток субгранулярной и субвентрикулярной зон не отличалось от контроля. В этих клетках обнаружено существенное увеличение *DJ-1* в области ядра, свидетельствующее в пользу транслокации этого белка в ядро нейрональных стволовых клеток. С учётом того, что именно клетки субгранулярной и субвентрикулярной зон имеют отношение к процессам нейрогенеза во взрослом мозге, увеличение ядерной локализации белка *DJ-1* рассматриваются в качестве компенсаторной реакции при МФТП-индуцированном паркинсонизме [75]. Введение той же суммарной дозы МФТП мышам C57BL/6 по несколько иной схеме (4 инъекции по 20 мг/кг с интервалом в 24 ч) приводило к существенному снижению уровня дофамина и его метаболитов (3,4-дигидроксифенилуксусной и гомованилиновой кислот). Сверхэкспрессия паркина и *DJ-1*



(путём введения соответствующих генетических конструкций в составе рекомбинантного аденоассоциированного вируса) не предотвращала снижения дофамина в стриатуме, но снижала гибель дофаминергических нейронов, индуцированную введением МФТП [76].

Введение МФТП мышам, лишённым *DJ-1* (*DJ-1<sup>-/-</sup>*), вызывало существенно большую гибель нигростриатных нейронов, по сравнению с мышами (*DJ-1<sup>+/+</sup>*), экспрессирующими этот белок. Эффект был особенно заметен через 14 дней после введения нейротоксина [77]. Восстановление экспрессии белка DJ-1 путём введения мышам *DJ-1<sup>-/-</sup>* аденовирусной конструкции, экспрессирующей DJ-1, за неделю до введения МФТП способствовало повышению уровня этого белка в чёрной субстанции и ослабляла эффект этого нейротоксина на гибель клеток [77]. Следует отметить, что мыши *DJ-1<sup>-/-</sup>* не отличались от контрольных животных дикого типа практически по всем исследованным параметрам [78], включая количество нейронов в чёрной субстанции мозга и уровень дофамина чёрной субстанции. Снижение индуцированного выброса дофамина, выявленное у таких животных, нормализовалось блокадой обратного захвата дофамина [78]. Однако высокочастотная стимуляция кортикостриатных терминалей таких животных не приводила к индукции долговременной депрессии (LTD), что связывают с отсутствием регуляции дофаминовых D2-рецепторов при участии DJ-1 [78].

Трёхкратное введение МФТП (15 мг/кг с интервалом в 2 ч) мышам C57BL/6J также приводило к снижению уровня дофамина, обнаруживаемому в стриатуме через 3 дня после введения МФТП. При этом соотношение окисленной и неокисленной форм белка DJ-1, определяемое с помощью специфических антител (с использованием в качестве контроля мышей с нокаутированным геном *DJ-1*), значимо не менялось в первые две недели, но повышалось в чёрной субстанции, стриатуме и обонятельной луковице через 6 недель после введения МФТП [16].

В экспериментах на клетках M17 нейробластомы человека, экспрессирующих белок DJ-1 дикого типа, а также мутанты, несущие аминокислотные замены C46A, C53A и C106A, было установлено, что только DJ-1 дикого типа и мутант C53A снижали проявления токсического действия МФП<sup>+</sup>. При этом мутация именно остатка цистеина C106A предупреждала транслокацию белка DJ-1 в митохондрии [14].

Другие аминокислотные замены (R98Q, D149A и особенно L166P) повышали чувствительность клеток M17 нейробластомы человека к МФП<sup>+</sup> [43].

В аналогичных экспериментах с использованием в качестве нейротоксического агента севофлурана (средство для наркоза) показано, что клетки M17 нейробластомы человека, стабильно экспрессирующие DJ-1 дикого типа или мутант L166P, отвечают на присутствие этого вещества в среде культивирования увеличением уровня мРНК и белка DJ-1 [79]. При этом только DJ-1 дикого типа оказывал защитное действие, способствуя снижению активных форм кислорода и азота (NO).

**Ротенон-индуцированный паркинсонизм.** Другая модель БП предусматривает повторные инъекции пестицида ротенона животным (крысам или мышам); это приводит к ингибированию комплекса I в мозге [80, 81] и периферических органах [82]. Хотя гистопатологические и другие исследования выявили несколько критически важных органов-мишеней этого токсина [82], введение ротенона вызывало преимущественную дегенерацию нигростриатной дофаминергической системы в мозге и воспроизводило основные симптомы БП [80, 81].

При введении ротенона (2 мг/кг) крысам Спрэгг–Доули в течение 4-х недель происходило развитие двигательных нарушений, свойственных БП, и увеличение экспрессии белка DJ-1, а также фактора Nrf2 и гемоксигеназы-1 в среднем мозге и стриатуме [83]. Введение ротенона крысам Льюис приводило к развитию характерных для БП двигательных нарушений и существенному (38%) снижению нейронов чёрной субстанции, экспрессирующих тирозингидроксилазу [84]. Экспрессия человеческого гена *DJ-1* в астроцитах этих животных существенно снижала потерю дофаминергических нейронов. При этом в дофаминергических нейронах чёрной субстанции отмечено снижение уровня  $\alpha$ -синуклеина и его фосфорилирования и увеличение экспрессии белка, ассоциированного с мембраной лизосом (маркера LAMP-2A) – маркера опосредованной шаперонами аутофагии [84]. Эти данные свидетельствуют о том, что нейропротекторное действие белка DJ-1 не ограничивается экспрессирующими его клетками, а распространяется и на соседние нейроны.

Цитотоксическое действие ротенона воспроизводилось и в опытах с изолированными клетками: культивирование первичных нейронов среднего мозга 17-дневных эмбрионов в присутствии 100 нМ ротенона приводило к 10-кратному снижению числа клеток, экспрессирующих тирозингидроксилазу (уровень других, недофаминергических нейронов снижался не столь драматично) [85]. Трансдукция гена, кодирующего DJ-1 дикого типа, но не мутантных

## Взаимодействие белка DJ-1 с белками-партнёрами

Белки-партнёры DJ-1	Экспериментальная модель	Локализация комплекса	Биологический эффект	Ссылки
DJ-1 (димеризуется)	трансфекция мутантных форм DJ-1 человека (L166P, L10P и P158DEL, делеции) в клетки CHO	Я, Ц	нарушена стабильность; фолдинг и способность к димеризации у мутантных БП-форм	[10]
$\alpha$ -Синуклеин (мономеры и олигомеры)	моделирование паркинсонизма на клеточных культурах (SH-SY5Y) и у животных (мыши)	Л	нокаут <i>DJ-1</i> приводит к повышенной агрегации альфа синуклеина; сверхэкспрессия DJ-1 снижает уровень альфа синуклеина	[54, 55]
Тау белок	культура клеток IMR; технология редактирования генома CRISPR; мутанты тау белка P301L	Ц	мутантный тау белок (P301L) сильнее взаимодействует с DJ-1	[56]
Паркин и PINK1 (pten-induced kinase 1)	культуры клеток SH-SY5Y и HEK293; лизаты мозга человека	МХ, Ц	в комплексе появляется убиквитинлигазная активность	[19, 57]
Субъединицы NDUFA4 и ND1 митохондриального комплекса I	культуры клеток NIH3T3 и HEK293	МХ	нокдаун <i>DJ-1</i> приводит к снижению активности комплекса I др. дефектам митохондрий	[38]
Фактор сплайсинга PSF (Polypyrimidine tract-binding protein-associated splicing factor)	культуры клеток SH-212, SHSY5Y, HeLa, HEK293; лимфоциты пациентов с БП с патогенной мутацией гена DJ-1-белка	Я	регуляция экспрессии гена тирозингидроксилазы с помощью DJ-1 и PSF; DJ-1 ингибирует сумоилирование PSF и подавление синтеза тирозингидроксилазы	[52]
E3-Убиквитинлигаза VHL (Von Hippel-Lindau)	клетки SH-SY5Y; убиквитинирование <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	Ц, Я	VHL образует комплекс с HIF-1 $\alpha$ ; DJ-1 ингибирует образование комплекса HIF-VHL, препятствует убиквитинированию	[20, 58]
E3-Убиквитинлигаза TRAF 6	аутопсийные препараты мозга пациентов с БП; клетки SH-SY5Y; L166P мутанты DJ-1	Ц	убиквитинирование DJ-1 под действием TRAF 6 способствует образованию агрегатов мутантных DJ-1	[21, 22]
20S-Протеасома	протеасомы печени крысы; BL21(DE3) штамм <i>Escherichia coli</i> ; трансформированный вектором pET-15b-hDJ-1, несущим ДНК DJ-1WT либо DJ-1C106A человека	Ц	образование комплекса тормозит активность 20S-протеасомы и уменьшает деградацию частично развёрнутых белков	[27]
Тиоредоксин 1 (Trx1)	клетки SH-SY5Y, SY5Y, HeLa; мутантные (M26I и L166P) формы DJ-1; DJ-1-нокаутные мыши	Ц, Я	DJ-1 ингибирует активацию ASK1, предотвращая диссоциацию комплекса Trx1 с ASK1 и увеличивая транскрипцию Trx1	[59, 60]
p53 – супрессор опухоли	культуры клеток HEK293T, A549, H1299; моделирование окислительного стресса	Ц, Я	DJ-1 регулирует/ингибирует транскрипционную активность p53	[50, 51]
ERK1/2 и ERK2 (extracellular signal-regulated kinase)	клетки HEK293T – DJ-1 нокаун; лизаты мозга мышей – DJ-1 нокаут	Ц, Я	транслокация Erk1/2 в ядро в условиях окислительного стресса; активация Elk1, способствующая экспрессии супероксиддисмутазы 1 (SOD1)	[61]
ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1)	клетки HEK293, MEF, HeLa	Ц	образование комплекса ингибирует активность ASK1	[62–64]
Проапоптотический белок Daxx (Death-associated protein 6)	дрожжевой двухгибридный скрининг; клетки SH-SY5Y, COS-7	Я	связывая Daxx, DJ-1 удерживает его в ядре и препятствует активации ASK1 и апоптозу	[46]

Окончание таблицы

Белки-партнёры DJ-1	Экспериментальная модель	Локализация комплекса	Биологический эффект	Ссылки
$\beta$ -Субъединица АТФ-синтазы	культуры клеток HEK293	МХ	взаимодействие DJ-1 с $\beta$ -субъединицей АТФ-синтазы снижает утечку протонов и повышает продукцию АТФ	[41]
Каталитическая субъединица протеинкиназы А (PKA $\alpha$ )	система <i>in vitro</i>	Ц	PKA $\alpha$ фосфорилирует DJ-1 по T154	[32]
PRAK/MK5 (p38 regulated/activated kinase)	клетки HEK293, NIH3T3, HeLa, PRAK <sup>+/+</sup> и PRAK <sup>-/-</sup> клетки MEF	Я	PRAK образует комплекс с DJ-1 и фосфорилирует DJ-1 <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	[33]
Фосфатаза PTEN	культуры клеток NIH3T3, HEK293A	Ц	образование комплекса с DJ-1 тормозит активность PTEN	[65, 66]
PIAS $\chi$ $\alpha$ /ARIP3 (protein inhibitor of activated STAT) $\chi$ $\alpha$ /androgen receptor-interacting protein 3	клетки 293T, Cos1, TM4, HepG2, CV1	Я	DJ-1 – позитивный регулятор андрогенного рецептора (AR); связываясь с модулятором AR (PIAS $\chi$ $\alpha$ /ARIP3), способствует восстановлению транскрипции AR, удаляя PIAS $\chi$ $\alpha$ из комплекса с AR	[47]
DJBP (DJ-1 binding protein)	клетки 293T, Cos1; экстракты тестикул быка; экспрессия F-DJ-1 и DJBP в <i>E. coli</i>	Я	DJ-1, DJBP и AR формируют тройной комплекс, в котором DJ-1 ассоциирует с AR посредством связывания с DJBP; DJ-1 способствует активации транскрипции AR	[48]
TTRAP (TRAF and TNF receptor-associated protein)	мутантные M26I и L166P DJ-1; клетки SH-SY5Y, HEK-293T	Ц, Я	связывание с мутантами DJ-1 вызывает JNK- и p38 MAPK-индуцированный апоптоз	[67]
Cezanne/Za20d1, деубиквитиназа семейства A20, ингибирующая активность фактора транскрипции NF- $\kappa$ B	клетки MEF, H157, HEK293T; мутантные FLAG-DJ-1	Я, Ц	связывание с DJ-1 ингибирует деубиквитиназу Cezanne; это способствует перемещению NF- $\kappa$ B в ядро и предотвращает гибель клеток	[68]
Рецепторная тирозинкиназа HER3 (ErbB-3)	клетки HEK293T и CHO; ксенотрансплантантная модель опухоли у мышей	Я	взаимодействие с DJ-1 защищает HER3 от убиквитинирования и последующей протеасомной деградации	[69]

Примечание. Обозначения: Я – ядро клетки, Ц – цитоплазма, МХ – митохондрии, Л – лизосомы.

форм DJ-1 (M26I, E64), увеличивала процент экспрессирующих тирозингидроксилазу клеток.

**Паркинсонизм, индуцированный 6-гидрокси-дофамином.** Это ещё одна популярная модель БП, механизм которой включает накопление токсина в катехоламинергических нейронах за счёт дофаминового или норадреналинового транспортёров [86]. Поскольку фармакологическая блокада этих транспортёров предупреждает развитие токсических проявлений, это указывает, что именно транспорт 6-гидрокси-дофамин является ключевым патогенетическим моментом. Поступая внутрь нейронов, 6-гидрокси-дофамин индуцирует оксидативный стресс, обусловленный как автоокислением этого амина, так и окислительным дезаминированием

под действием моноаминоксидазы А с образованием пероксида водорода. Образующиеся при этом активные формы кислорода оказывают повреждающее действие на нейроны. В связи с тем, что 6-гидрокси-дофамин не проникает через гематоэнцефалический барьер, его вводят непосредственно в мозг методом стереотаксической хирургии [86]. Введённый таким образом в стриатум мышей C57bl/6 или трансгенных мышей с нокаутом гена *DJ-1* 6-гидрокси-дофамин вызывал снижение уровня дофамина и иммуногистохимически выявляемой тирозингидроксилазы [87]. При этом изменения были более выражены у животных с нокаутом гена *DJ-1*.

Исследования, выполненные на первичных культурах астроцитов мышей C57bl/6 или транс-

генных мышей с нокаутом гена *DJ-1*, также продемонстрировали большую уязвимость клеток животных с нокаутом *DJ-1* к 6-гидроксидофамину [87]. При этом астроциты животных с нокаутированным *DJ-1* хуже защищали нейроны от токсического действия в ходе их сокультивирования в присутствии увеличивающихся концентраций нейротоксина, а также реагировали повышенной экспрессией ядерного фактора Nrf2 и гемоксигеназы 1 при более высоких концентрациях 6-гидроксидофаминина [87]. Последнее свидетельствует об участии других регуляторов (помимо *DJ-1*) в активации ядерного фактора Nrf2 и гемоксигеназы 1.

В условиях токсического действия 6-гидроксидофаминина на клетки (SH-SY5Y) *DJ-1* может окисляться; при этом снижение клеточного GSH предшествует окислению *DJ-1* [88]. При введении 6-гидроксидофаминина в чёрную субстанцию (*substantia nigra pars compacta*) крыс Вистар происходило накопление окисленных форм *DJ-1* в мембранной фракции и снижение этого белка в цитозоле [89], что согласуется с известными представлениями о транслокации *DJ-1* в митохондрии.

На дофаминергических нейронах MN9D показано, что выключение гена *DJ-1* при помощи малой шпилечной РНК повышало чувствительность клеток к 6-гидроксидофамину, который способствовал накоплению активных форм кислорода и ускорял апоптоз [90]. При этом нокаут *DJ-1* изменял уровень 27 белков. В контексте оксидативного стресса особенно важным было снижение уровня пероксиредоксина 6.

Как и в случае других экспериментальных моделей БП, нейротоксический эффект 6-гидроксидофаминина был более выражен на животных с нокаутом гена *DJ-1* (*DJ-1<sup>-/-</sup>*), а также первичной культуре нейронов среднего мозга, полученных от этих животных [91]. В клетках PC12/TetOn, экспрессирующих  $\alpha$ -синуклеин с аминокислотной заменой, связанной с БП (A30P), сайленсинг *DJ-1* повышал токсичность мутанта  $\alpha$ -синуклеина.

Введение проникающей в клетки формы рекомбинантного белка *DJ-1* (ТАТ-*DJ-1*) в стриатум мышей *DJ-1<sup>-/-</sup>* снижало нейротоксические проявления, индуцированные 6-гидроксидофаминном [91]. Это свидетельствует о возможном терапевтическом потенциале белка *DJ-1*.

### ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ БЕЛКА *DJ-1* И ЕГО ЛИГАНДОВ

Помимо обнаруженного «терапевтического» эффекта проникающей в клетки формы реком-

бинантного белка *DJ-1* (ТАТ-*DJ-1*), был исследован 13-членный фрагмент аминокислотной последовательности *DJ-1*, присоединённый к проникающему в клетки гептапептиду ТАТ-белка [92]. Эта конструкция, получившая название ND-13, была исследована на моделях паркинсонизма, индуцированного введением 6-гидроксидофаминина или МФТП. На культурах клеток SH-SY5Y ND-13 снижал повреждающее действие 6-гидроксидофаминина, не влияя на их пролиферацию. В разных вариантах парентерального введения (интрастриатно, подкожно или внутривенно) животным ND-13 ослаблял токсические проявления, вызванные 6-гидроксидофаминном (индуцированная амфетаминототация крыс, уровень дофаминина и тирозингидроксилазы). Этот эффект был обнаружен как у животных, экспрессирующих *DJ-1*, так и у животных с нокаутированным геном *DJ-1*. Интересно, что в этих экспериментах выраженность снижения уровня дофаминина при введении одного 6-гидроксидофаминина и «повышение» (а точнее предупреждение снижения) этого показателя под действием ND-13 были практически одинаковы у нокаутных и экспрессирующих *DJ-1* животных [92]. В модели МФТП-индуцированного паркинсонизма (25 мг/кг в течение 5 дней) совместное с нейротоксином введение пептида ND-13 животным в дозе 20 мг/кг снижало падение уровня дофаминина в чёрной субстанции и числа дофаминергических нейронов, экспрессирующих тирозингидроксилазу [92]. Одним из возможных кандидатов, опосредующих нейропротекторные эффекты пептида ND-13, может быть ядерный фактор Nrf2. Хотя инкубация ND-13 с интактными клетками не оказывала влияния на транслокацию Nrf2 в ядро; при совместном добавлении ND-13 и 6-гидроксидофаминина отмечено увеличение уровня мРНК и транслокация белка Nrf2 в ядро [92].

Терапевтическим потенциалом обладают и лиганды *DJ-1*. Проведённый среди 30 000 структур виртуальный скрининг (*in silico*) веществ, способных связываться с *DJ-1*, выявил соединения UCP0045037 и UCP0054278 (рис. 3), которые взаимодействовали с восстановленным или окисленным (по C106) белком [93]. Помимо *DJ-1* дикого типа они взаимодействовали и с мутантами, имеющими отношение к БП (L166P, M26I). Предварительное в течение суток культивирование клеток SH-SY5Y или нейронов среднего мозга крысы в присутствии 1 мкМ UCP0045037 снижало нейротоксический эффект увеличивающихся (0–400 мкМ) концентраций H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Аналогичный цитопротекторный эффект 1 мкМ UCP0045037 и 1 мкМ UCP0054278 отмечен и при воздействии нейро-

токсина 6-гидроксидофамина (диапазон концентраций 0–100 мкМ) на эти клетки [93]. На клетках с выключенным геном *DJ-1* цитопротекторные эффекты лигандов этого белка отсутствовали. Оба соединения (UCP0045037 и UCP0054278) проникали через гематоэнцефалический барьер и на модели БП, индуцированной введением 6-гидроксидофамина, снижали выраженность двигательных нарушений и повышали число выживших дофаминергических нейронов [93].

Нейропротекторное действие DJ-1 и его лиганда было также продемонстрировано на модели фокальной ишемии-реперфузии, индуцированной у крыс окклюзией средней мозговой артерии: введение рекомбинантного белка DJ-1 [94] или соединения UCP0045037 уменьшало размер инфарктной зоны мозга [95].

Ещё один лиганд – соединение 23, селективность взаимодействия которого с DJ-1 была подтверждена на клетках с выключенным геном *DJ-1*, проявлял нейропротекторное действие в модели МФТП-индуцированного паркинсонизма [96]. Мышам дикого типа и мышам с нокаутированным геном *DJ-1* вводили соединение 23 (в дозе 1 мг/кг), а через 1 ч – МФТП (30 мг/кг). Терапевтический эффект анализировали через 5 дней после введения МФТП. Соединение 23 снижало проявления двигательных нарушений, вызванных МФТП, а также гибель клеток в чёрной субстанции и стриатуме и падение уровня дофамина. На животных, дефектных по белку DJ-1, данное вещество терапевтического эффекта не оказывало [96]. Это свидетельствует о высокой специфичности действия соединения 23 на конкретную мишень – белок DJ-1.

Ещё одним веществом, взаимодействующим с DJ-1, является изатин [97]. Изатин (индол-2,3-дион) – эндогенный биологический регулятор, обнаруженный в мозге, периферических тканях и биологических жидкостях человека и животных [28, 98, 99]. Широкий спектр биологической активности изатина опосредуется многочисленными изатин-связывающими белками [98, 99]. Физиологические концентрации изатина *in vitro* ингибируют моноаминоксидазу Б (МАО Б) и гуанилатциклазу рецепторов натрийуретических пептидов, более высокие (нейропротекторные) концентрации (от 50 мкМ до 400 мкМ) вызывают апоптоз клеточных линий различных (в том числе злокачественных) опухолей и влияют на экспрессию генов [98]. При введении *in vivo* изатин ослабляет проявления паркинсонизма, индуцированного введением МФТП, что связывают со снижением превращения МФТП в МФП<sup>+</sup> в результате

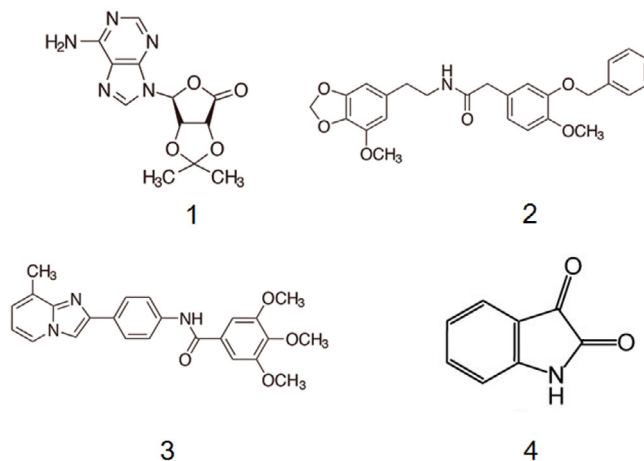


Рис. 3. Структуры лигандов белка DJ-1, использованных в экспериментальных моделях БП. В скобках приведены ссылки на работы, в которых эти лиганды были использованы. 1 – Соединение UCP0045037: 5 $\alpha$ -(6-Амино-9Н-пурин-9-ил)-4,5-дигидро-3 $\beta$ ,4 $\beta$ -(изопропилидендиокси)-2(3Н)-фуранон [93–95]; 2 – соединение UCP0054278: 2-[3-(Бензилокси)-4-метоксифенил]-N-[2-(7-метокси-2Н-1,3-бензодиоксол-5-ил)этил]ацетамид [93–95]; 3 – соединение 23: N-[4-(8-метил(4-гидроимидазо[1,2-а]пиридин-2-ил))фенил(3,4,5-триметоксифенил)карбоксамид [96]; 4 – изатин (индол-2,3-дион) [97]

конкурентного ингибирования МАО Б [72–74]. Кроме того, эта нейропротекторная доза изатина вызывает многоуровневые изменения в мозге, затрагивающие протеом [99].

Сродство DJ-1 к изатину ( $K_D = 3,2$  мкМ; [97]) сопоставимо со сродством к этому регулятору глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы – другой привлекательной фармакологической мишени нейропротекторных соединений [100]. С учётом этих данных становится все более очевидным, что известное нейропротекторное действие изатина, очевидно, связано не только с торможением активности МАО Б, но и с взаимодействием с другими важными в контексте нейропротекции белками, включая DJ-1. Интересно отметить, что в некоторых исследованиях белок DJ-1 был идентифицирован в группе изатин-связывающих белков, специфичных для мозга контрольных мышей, однако при введении нейропротекторной дозы изатина (100 мг/кг) этот белок с аффинным сорбентом не связывался [101]. С учётом того, что изатин проникает через гематоэнцефалический барьер и накапливается в мозге, это подтверждает тот факт, что именно взаимодействие DJ-1 с изатином препятствует связыванию этого белка с аффинным сорбентом, содержащим аналог изатина в качестве лиганда.

Ряд аналогов изатина характеризовался более прочным связыванием с белком DJ-1

( $K_D < 1$  мкМ) и эффективным торможением глиоксалазной активности, измеренной с фенилглиоксалем в качестве субстрата ( $IC_{50} < 0,5$  мкМ) [97]. Открытие аналогов изатина, эффективно тормозящих каталитические функции, даёт в руки исследователей мощный инструмент, который позволит оценить вклад фермента протеиндегликазы в нейропротекторные функции белка DJ-1.

Создание зонда, ковалентно связывающегося с (восстановленными) остатками цистеина белка DJ-1 [102], существенно расширяет возможности исследований белка в живых системах. Протеомный анализ нескольких линий клеток (HeLa, A549, SH-SY5Y), меченных этим зондом, продемонстрировал преимущественное включение метки именно в DJ-1, которое снижалось в условиях оксидативного стресса [102]. Использование соединений, избирательно действующих на каталитически активную (вос-

становленную) форму DJ-1, позволит «разграничить» ферментативные и неферментативные механизмы действия этого белка в норме и при патологии.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Данная работа не предполагала использования людей и животных в качестве объектов исследования. Обобщённые в обзоре результаты исследований авторов оригинальных работ были выполнены с одобрения соответствующих комитетов по этике, указанные в каждой процитированной статье.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Obeso, J. A., Stamelou, M., Goetz, C. G., Poewe, W., Lang, A. E., et al. (2017) Past, present, and future of Parkinson's disease: a special essay on the 200th anniversary of the shaking palsy, *Mov. Disord.*, **32**, 1264–1310, doi: 10.1002/mds.27115.
- Klein, C., and Westenberger, A. (2012) Genetics of Parkinson's disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **2**, a008888, doi: 10.1101/cshperspect.a008888.
- Buneeva, O. A., and Medvedev, A. E. (2006) Ubiquitin-protein ligase parkin and its role in the development of Parkinson's disease, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 851–860.
- Nagakubo, D., Taira, T., Kitaura, H., Ikeda, M., Tamai, K., et al. (1997) DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **231**, 509–513, doi: 10.1006/bbrc.1997.6132.
- Bonifati, V., Rizzu, P., van Baren, M. J., Schaap, O., Breedveld, G. J., et al. (2003) Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism, *Science*, **299**, 256–259.
- Djarmati, A., Hedrich, K., Svetel, M., Schäfer, N., Juric, V., et al. (2004) Detection of Parkin (PARK2) and DJ1 (PARK7) mutations in early-onset Parkinson's disease: Parkin mutation frequency depends on ethnic origin of patients, *Hum. Mutat.*, **23**, 525, doi: 10.1002/humu.9240.
- Kumaran, R., Vandrovцова, J., Luk, C., Sharma, S., Renton, A., et al. (2009) Differential DJ-1 gene expression in Parkinson's disease, *Neurobiol. Disease*, **36**, 393–400, doi: 10.1016/j.nbd.2009.08.011.
- Cookson, M. R. (2010) DJ-1, PINK1 and their effects on mitochondrial pathways, *Mov. Disord.*, **25** (Suppl. 1), S44–S48, doi: 10.1002/mds.22713.
- Lee, S. J., Kim, S. J., Kim, I. K., Ko, J., Jeong, C. S., et al. (2003) Crystal structures of human DJ-1 and *Escherichia coli* Hsp31, which share an evolutionarily conserved domain, *J. Biol. Chem.*, **278**, 44552–44559, doi: 10.1074/jbc.M304517200.
- Ramsey, C. P., and Giasson, B. I. (2010) L10p and P158DEL DJ-1 mutations cause protein instability, aggregation, and dimerization impairments, *J. Neurosci. Res.*, **88**, 3111–3124, doi: 10.1002/jnr.22477.
- Moore, D. J., Zhang, L., Dawson, T. M., and Dawson, V. L. (2003) A missense mutation (L166P) in DJ-1, linked to familial Parkinson's disease, confers reduced protein stability and impairs homo-oligomerization, *J. Neurochem.*, **87**, 1558–1567.
- Lakshminarasimhan, M., Maldonado, M. T., Zhou, W., Fink, A. L., and Wilson, M. A. (2008) Structural impact of three parkinsonism-associated missense mutations on human DJ-1, *Biochemistry*, **47**, 1381–1392.
- Malgieri, D., and Eliezer, D. (2008) Structural effects of Parkinson's disease linked DJ-1 mutations, *Prot. Sci.*, **17**, 855–868, doi: 10.1110/ps.073411608.
- Canet-Avilés, R. M., Wilson, M. A., Miller, D. W., Ahmad, R., McLendon, C., et al. (2004) The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfenic acid-driven mitochondrial localization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 9103–9108, doi: 10.1073/pnas.0402959101.
- Zhou, W., Zhu, M., Wilson, M. A., Petsko, G. A., and Fink, A. L. (2006) The oxidation state of DJ-1 regulates its chaperone activity toward alpha-synuclein, *J. Mol. Biol.*, **356**, 1036–1048, doi: 10.1016/j.jmb.2005.12.030.
- Mita, Y., Kataoka, Y., Saito, Y., Kashi, T., Hayashi, K., et al. (2018) Distribution of oxidized DJ-1 in Parkinson's disease-related sites in the brain and in the peripheral tissues: effects of aging and a neurotoxin, *Sci. Rep.*, **8**, 12056, doi: 10.1038/s41598-018-30561-z.
- Shimbo, Y., Niki, T., Taira, T., Ooe, H., Takahashi-Niki, K., et al. (2006) Proper SUMO-1 conjugation is essential to DJ-1 to exert its full activities, *Cell Death Differ.*, **13**, 96–108.

18. Ariga, H., Takahashi-Niki, K., Kato, I., Maita, H., Niki, T., and Iguchi-Ariga, S. M. (2013) Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's disease, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2013**, 683920, doi: 10.1155/2013/683920.
19. Xiong, H., Wang, D., Chen, L., Choo, Y. S., Ma, H., Tang, C., et al. (2009) Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation, *J. Clin. Invest.*, **119**, 650-660, doi: 10.1172/JCI37617.
20. Parsanejad, M., Zhang, Y., Qu, D., Irrcher, I., Rousseaux, M. W. C., et al. (2014) Regulation of the VHL/HIF-1 Pathway by DJ-1, *J. Neurosci.*, **34**, 8043-8050.
21. Zucchelli, S., Codrich, M., Marcuzzi, F., Pinto, M., Vilotti, S., et al. (2010) TRAF6 promotes atypical ubiquitination of mutant DJ-1 and alpha-synuclein and is localized to Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease brains, *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 3759-3770, doi: 10.1093/hmg/ddq290.
22. Vilotti, S., Codrich, M., Dal Ferro, M., Pinto, M., Ferrer, I., et al. (2012) Parkinson's disease DJ-1 L166P alters rRNA biogenesis by exclusion of TTRAP from the nucleolus and sequestration into cytoplasmic aggregates via TRAF6, *PLoS One*, **7**, e35051, doi: 10.1371/journal.pone.0035051.
23. Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system, *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 425-479, doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.425.
24. Chen, Z. J., and Sun, L. J. (2009) Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling, *Mol. Cell*, **33**, 275-286.
25. Buneeva, O. A., and Medvedev, A. E. (2017) The role of atypical ubiquitination in cell regulation, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. B Biomed. Chem.*, **11**, 16-31, doi: 10.1134/S1990750817010024.
26. Van Huizen, M., and Kikkert, M. (2020) The role of atypical ubiquitin chains in the regulation of the antiviral innate immune response, *Front. Cell Dev. Biol.*, **7**, 392, doi: 10.3389/fcell.2019.00392.
27. Moscovitz, O., Ben-Nissan, G., Fainer, I., Pollack, D., Mizrachi, L., and Sharon, M. (2015) The Parkinson's-associated protein DJ-1 regulates the 20S proteasome, *Nat. Commun.*, **6**, 6609, doi: 10.1038/ncomms7609.
28. Buneeva, O. A., Medvedev, M. V., Kopylov, A. T., and Medvedev, A. E. (2019) Ubiquitin subproteome of brain mitochondria and its changes induced by experimental parkinsonism and action of neuroprotectors, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1359-1374, doi: 10.1134/S0006297919110117.
29. Xu, X., Martin, F., and Friedman, J. S. (2010) The familial Parkinson's disease gene DJ-1 (PARK7) is expressed in red cells and plays a role in protection against oxidative damage, *Blood Cells Mol. Dis.*, **45**, 227-232, doi: 10.1016/j.bcmd.2010.07.014.
30. Giroto, S., Cendron, L., Bisaglia, M., Tessari, I., Mammì, S., et al. (2014) DJ-1 is a copper chaperone acting on SOD1 activation, *J. Biol. Chem.*, **289**, 10887-10899, doi: 10.1074/jbc.M113.535112.
31. Yamashita, S., Mori, A., Kimura, E., Mita, S., Maeda, Y., et al. (2010) DJ-1 forms complexes with mutant SOD1 and ameliorates its toxicity, *J. Neurochem.*, **113**, 860-870, doi: 10.1111/j.1471-4159.2010.06658.x.
32. Ko, Y. U., Kim, S. J., Lee, J., Song, M. Y., Park, K. S., et al. (2019) Protein kinase A-induced phosphorylation at the Thr154 affects stability of DJ-1, *Parkinsonism Relat. Disord.*, **66**, 143-150, doi: 10.1016/j.parkreldis.2019.07.029.
33. Tang, J., Liu, J., Li, X., Zhong, Y., Zhong, T., et al. (2014) PRAK interacts with DJ-1 and prevents oxidative stress-induced cell death, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2014**, 735618, doi: 10.1155/2014/735618.
34. Scumaci, D., Olivo, E., Fiumara, C. V., La Chimia, M., De Angelis, M. T., et al. (2020) DJ-1 proteoforms in breast cancer cells: the escape of metabolic epigenetic misregulation, *Cells*, **9**, 1968, doi: 10.3390/cells9091968.
35. Richarme, G., Mihoub, M., Dairou, J., Bui, L. C., Leger, T., and Lamouri, A. (2015) Parkinsonism-associated protein DJ-1/Park7 is a major protein deglycase that repairs methylglyoxal- and glyoxal-glycated cysteine, arginine, and lysine residues, *J. Biol. Chem.*, **290**, 1885-1897.
36. Sharma, N., Rao, S. P., and Kalivendi, S. V. (2019) The deglycase activity of DJ-1 mitigates  $\alpha$ -synuclein glycation and aggregation in dopaminergic cells: Role of oxidative stress mediated downregulation of DJ-1 in Parkinson's disease, *Free Radic. Biol. Med.*, **135**, 28-37, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.02.014.
37. Richarme, G., Liu, C., Mihoub, M., Abdallah, J., Leger, T., et al. (2017) Guanine glycation repair by DJ-1/Park7 and its bacterial homologs, *Science*, **357**, 208-211, doi: 10.1126/science.aag1095.
38. Hayashi, T., Ishimori, C., Takahashi-Niki, K., Taira, T., Kim, Y. C., et al. (2009) DJ-1 binds to mitochondrial complex I and maintains its activity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**, 667-672, doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.025.
39. Buneeva, O., Fedchenko, V., Kopylov, A., and Medvedev, A. (2020) Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease: focus on mitochondrial DNA, *Biomedicines*, **8**, E591, doi: 10.3390/biomedicines8120591.
40. Hauser, D. N., Primiani, C. T., Langston, R. G., Kumaran, R., and Cookson, M. R. (2015) The Polg mutator phenotype does not cause dopaminergic neurodegeneration in DJ-1-deficient mice, *eNeuro*, **2**, doi: 10.1523/ENEURO.0075-14.2015.
41. Chen, R., Park, H. A., Mnatsakanyan, N., Niu, Y., Licznerski, P., et al. (2019) Parkinson's disease protein DJ-1 regulates ATP synthase protein components to increase neuronal process outgrowth, *Cell Death Dis.*, **10**, 469, doi: 10.1038/s41419-019-1679-x.
42. Hao, L. Y., Giasson, B. I., and Bonini, N. M. (2010) DJ-1 is critical for mitochondrial function and rescues PINK1 loss of function, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 9747-9752.
43. Wang, X., Petrie, T. G., Liu, Y., Liu, J., Fujioka, H., and Zhu, X. (2012) Parkinson's disease-associated DJ-1 mutations impair mitochondrial dynamics and cause mitochondrial dysfunction, *J. Neurochem.*, **121**, 830-839, doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07734.x.
44. Björkblom, B., Maple-Grødem, J., Puno, M. R., Odell, M., Larsen, J. P., and Møller, S. G. (2014) Reactive oxygen species-mediated DJ-1 monomerization modulates intracellular trafficking involving karyopherin  $\beta$ 2, *Mol. Cell. Biol.*, **34**, 3024-3040, doi: 10.1128/MCB.00286-14.
45. Lee, B. J., Cansizoglu, A. E., Suel, K. E., Louis, T. H., Zhang, Z., and Chook, Y. M. (2006) Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2, *Cell*, **126**, 543-558, doi: 10.1016/j.cell.2006.05.049.
46. Junn, E., Taniguchi, H., Jeong, B. S., Zhao, X., Ichijo, H., and Mouradian, M. M. (2005) Interaction of DJ-1 with Daxx inhibits apoptosis signal-regulating kinase 1 activity and cell death, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 9691-9696, doi: 10.1073/pnas.0409635102.
47. Takahashi, K., Taira, T., Niki, T., Seino, C., Iguchi-Ariga, S. M., and Ariga, H. (2001) DJ-1 positively regulates the

- androgen receptor by impairing the binding of PIASx alpha to the receptor, *J. Biol. Chem.*, **276**, 37556-37563, doi: 10.1074/jbc.M101730200.
48. Niki, T., Takahashi-Niki, K., Taira, T., Iguchi-Ariga, S. M., and Ariga, H. (2003) DJBP: a novel DJ-1-binding protein, negatively regulates the androgen receptor by recruiting histone deacetylase complex, and DJ-1 antagonizes this inhibition by abrogation of this complex, *Mol. Cancer Res.*, **1**, 247-261.
  49. Clements, C. M., McNally, R. S., Conti, B. J., Mak, T. W., and Ting, J. P. (2006) DJ-1, a cancer- and Parkinson's disease-associated protein, stabilizes the antioxidant transcriptional master regulator Nrf2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15091-15096, doi: 10.1073/pnas.0607260103.
  50. Shinbo, Y., Taira, T., Niki, T., Iguchi-Ariga, S. M., and Ariga, H. (2005) DJ-1 restores p53 transcription activity inhibited by Topors/p53BP3, *Int. J. Oncol.*, **26**, 641-648, doi: 10.3892/ijo.26.3.641.
  51. Kato, I., Maita, H., Takahashi-Niki, K., Saito, Y., Noguchi, N., et al. (2013) Oxidized DJ-1 inhibits p53 by sequestering p53 from promoters in a DNA-binding affinity-dependent manner, *Mol. Cell. Biol.*, **33**, 340-359, doi: 10.1128/MCB.01350-12.
  52. Zhong, N., Kim, C. Y., Rizzu, P., Geula, C., Porter, D. R., et al. (2006) DJ-1 transcriptionally up-regulates the human tyrosine hydroxylase by inhibiting the sumoylation of pyrimidine tractbinding protein-associated splicing factor, *J. Biol. Chem.*, **281**, 20940-20948, doi: 10.1074/jbc.M601935200.
  53. Ishikawa, S., Taira, T., Takahashi-Niki, K., Niki, T., Ariga, H., and Iguchi-Ariga, S. M. (2010) Human DJ-1-specific transcriptional activation of tyrosine hydroxylase gene, *J. Biol. Chem.*, **285**, 39718-39731, doi: 10.1074/jbc.M110.137034.
  54. Zondler, L., Miller-Fleming, L., Repici, M., Goncalves, S., Tenreiro, S., et al. (2014) DJ-1 interactions with alphasynuclein attenuate aggregation and cellular toxicity in models of Parkinson's disease, *Cell Death Dis.*, **5**, e1350, doi: 10.1038/cddis.2014.307.
  55. Xu, C. Y., Kang, W. Y., Chen, Y. M., Jiang, T. F., Zhang, J., et al. (2017) DJ-1 Inhibits alpha-synuclein aggregation by regulating chaperone-mediated autophagy, *Front. Aging Neurosci.*, **9**, 308, doi: 10.3389/fnagi.2017.00308.
  56. Wang, X., Williams, D., Müller, I., Lemieux, M., Dukart, R., et al. (2019) Tau interactome analyses in CRISPR-Cas9 engineered neuronal cells reveal ATPase-dependent binding of wild-type but not P301L Tau to non-muscle myosins, *Sci. Rep.*, **9**, 16238.
  57. Tang, B., Xiong, H., Sun, P., Zhang, Y., Wang, D., et al. (2006) Association of PINK1 and DJ-1 confers digenic inheritance of early-onset Parkinson's disease, *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 1816-1825.
  58. Vasseur, S., Afzal, S., Tardivel-Lacombe, J., Park, D. S., Iovanna, J. L., and Mak, T. W. (2009) DJ-1/PARK7 is an important mediator of hypoxia-induced cellular responses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 1111-1116.
  59. Im, J. Y., Lee, K. W., Junn, E., and Mouradian, M. M. (2010) DJ-1 protects against oxidative damage by regulating the thioredoxin/ASK1 complex, *Neurosci. Res.*, **67**, 203-208, doi: 10.1016/j.neures.2010.04.002.
  60. Im, J. Y., Lee, K. W., Woo, J. M., Junn, E., and Mouradian, M. M. (2012) DJ-1 induces thioredoxin 1 expression through the Nrf2 pathway, *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 3013-3024, doi: 10.1093/hmg/dd131.
  61. Wang, Z., Liu, J., Chen, S., Wang, Y., Cao, L., et al. (2011) DJ-1 modulates the expression of Cu/Zn-superoxide dismutase-1 through the Erk1/2-Elk1 pathway in neuroprotection, *Ann. Neurol.*, **70**, 591-599, doi: 10.1002/ana.22514.
  62. Waak, J., Weber, S. S., Görner, K., Schall, C., Ichijo, H., et al. (2009) Oxidizable residues mediating protein stability and cytoprotective interaction of DJ-1 with apoptosis signal-regulating kinase 1, *J. Biol. Chem.*, **284**, 14245-14257, doi: 10.1074/jbc.M806902200.
  63. Mo, J.-S., Jung, J., Yoon, J.-H., Hong, J.-A., Kim, M.-Y., et al. (2010) DJ-1 modulates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway through physical interaction with apoptosis signal-regulating kinase 1, *J. Cell. Biochem.*, **110**, 229-237, doi: 10.1002/jcb.22530.
  64. Cao, J., Ying, M., Xie, N., Lin, G., Dong, R., et al. (2014) The oxidation states of DJ-1 dictate the cell fate in response to oxidative stress triggered by 4-HPR: autophagy or apoptosis? *Antioxid. Redox Signal.*, **21**, 1443-1459, doi: 10.1089/ars.2013.5446.
  65. Kim, Y. C., Kitaura, H., Taira, T., Iguchi-Ariga, S. M., and Ariga, H. (2009) Oxidation of DJ-1-dependent cell transformation through direct binding of DJ-1 to PTEN, *Int. J. Oncol.*, **35**, 1331-1341.
  66. Choi, M. S., Nakamura, T., Cho, S.-J., Han, X., Holland, E. A., et al. (2014) Transnitrosylation from DJ-1 to PTEN attenuates neuronal cell death in parkinson's disease models, *J. Neurosci.*, **34**, 15123-15131, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4751-13.
  67. Zucchelli, S., Vilotti, S., Calligaris, R., Lavina, Z. S., Biagioli, M., et al. (2009) Aggresome-forming TTRAP mediates pro-apoptotic properties of Parkinson's disease-associated DJ-1 missense mutations, *Cell Death Differ.*, **16**, 428-438, doi: 10.1038/cdd.2008.169.
  68. McNally, R. S., Davis, B. K., Clements, C. M., Accavitti-Loper, M. A., Mak, T. W., and Ting, J. P. (2011) DJ-1 enhances cell survival through the binding of Cezanne, a negative regulator of NF-kappaB, *J. Biol. Chem.*, **286**, 4098-4106.
  69. Zhang, S., Mukherjee, S., Fan, X., Salameh, A., Mujoo, K., et al. (2016) Novel association of DJ-1 with HER3 potentiates HER3 activation and signaling in cancer, *Oncotarget*, **7**, 65758-65769, doi: 10.18632/oncotarget.11613.
  70. Cookson, M. R. (2005) The biochemistry of Parkinson's disease, *Annu. Rev. Biochem.*, **74**, 9-52.
  71. Mingazov, E. R., Khakimova, G. R., Kozina, E. A., Medvedev, A. E., Buneeva, O. A., et al. (2018) MPTP mouse model of preclinical and clinical Parkinson's disease as an instrument for translational medicine, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 2991-3006, doi: 10.1007/s12035-017-0559-6.
  72. Zhou, Y., Zhao, Z. Q., and Xie, J. X. (2001) Effect of isatin on rotational behavior and DA levels in caudate putamen in Parkinsonian rats, *Brain Res.*, **917**, 127-132.
  73. Hamaue, N., Minami, M., Terado, M., Hirafuji, M., Endo, T., et al. (2004) Comparative study of the effects of isatin, an endogenous MAO-inhibitor, and selegiline on bradykinesia and dopamine levels in a rat model of Parkinson's disease induced by the Japanese Encephalitis virus, *Neurotoxicology*, **25**, 205-213.
  74. Medvedev, A. E., Buneeva, O. A., Kopylov, A. T., Tikhonova, O. V., Medvedeva, M. V., et al. (2017) The brain mitochondrial subproteome of RPN10-binding proteins and its changes induced by the neurotoxin MPTP and the neuroprotector isatin, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 330-339.
  75. Sun, Y., Wang, Y., Zhao, X., and Pu, X. (2018) Nuclear translocation of DJ-1 protects adult neuronal stem cells in



- an MPTP mouse model of Parkinson's disease, *NeuroReport*, **29**, 301-307.
76. Paterna, J. C., Leng, A., Weber, E., Feldon, J., and Büeler, H. (2007) DJ-1 and Parkin modulate dopamine-dependent behavior and inhibit MPTP-induced nigral dopamine neuron loss in mice, *Mol. Ther.*, **15**, 698-704, doi: 10.1038/sj.mt.6300067.
77. Kim, R. H., Smith, P. D., Aleyasin, H., Hayley, S., Mount, M. P., et al. (2005) Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 5215-5220.
78. Goldberg, M. S., Pisani, A., Haburcak, M., Vortherms, T. A., Kitada, T., et al. (2005) Nigrostriatal dopaminergic deficits and hypokinesia caused by inactivation of the familial parkinsonism-linked gene DJ-1, *Neuron*, **45**, 489-496, doi: 10.1016/j.neuron.2005.01.041.
79. Zhang, Y., Li, Y., Han, X., Dong, X., Yan, X., and Xing, Q. (2018) Elevated expression of DJ-1 (encoded by the human PARK7 gene) protects neuronal cells from sevoflurane-induced neurotoxicity, *Cell Stress Chaperones*, **23**, 967-974.
80. Cannon, J. R., Tapias, V., Na, H. M., Honick, A. S., Drolet, R. E., and Greenamyre, J. T. (2009) A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease, *Neurobiol. Dis.*, **34**, 279-290.
81. Sanders, L. H., McCoy, J., Hu, X., Mastroberardino, P. G., Dickinson, B. C., et al. (2014) Mitochondrial DNA damage: Molecular marker of vulnerable nigral neurons in Parkinson's disease, *Neurobiol. Dis.*, **70**, 214-223.
82. Heinz, S., Freyberger, A., Lawrenz, B., Schladt, L., Schmuck, G., and Ellinger-Ziegelbauer, H. (2017) Mechanistic investigations of the mitochondrial complex I inhibitor rotenone in the context of pharmacological and safety evaluation, *Sci. Rep.*, **7**, 45465.
83. Michel, H. E., Tadros, M. G., Esmat, A., Khalifa, A. E., and Abdel-Tawab, A. M. (2017) Tetramethylpyrazine ameliorates rotenone-induced Parkinson's disease in rats: involvement of its anti-inflammatory and anti-apoptotic actions, *Mol. Neurobiol.*, **54**, 4866-4878.
84. De Miranda, B. R., Rocha, E. M., Bai, Q., El Ayadi, A., Hinkle, D., et al. (2018) Astrocyte-specific DJ-1 overexpression protects against rotenone-induced neurotoxicity in a rat model of Parkinson's disease, *Neurobiol. Disease*, **115**, 101-114.
85. Liu, F., Nguyen, J. L., Hulleman, J. D., Li, L., and Rochet, J. C. (2008) Mechanisms of DJ-1 neuroprotection in a cellular model of Parkinson's disease, *J. Neurochem.*, **105**, 2435-2453, doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05333.x.
86. Simola, N., Morelli, M., and Carta, A. R. (2007) The 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease, *Neurotoxicity Res.*, **11**, 151-167.
87. Lev, N., Barhum, Y., Ben-Zur, T., Melamed, E., Steiner, I., and Offen, D. (2013) Knocking out DJ-1 attenuates astrocytes neuroprotection against 6-hydroxydopamine toxicity, *J. Mol. Neurosci.*, **50**, 542-550.
88. Miyama, A., Saito, Y., Yamanaka, K., Hayashi, K., Hamakubo, T., and Noguchi, N. (2011) Oxidation of DJ-1 induced by 6-hydroxydopamine decreasing intracellular glutathione, *PLoS One*, **6**, e27883, doi: 10.1371/journal.pone.0027883.
89. Yanagida, T., Takata, K., Inden, M., Kitamura, Y., Taniguchi, T., et al. (2006) Distribution of DJ-1, Parkinson's disease-related protein PARK7, and its alteration in 6-hydroxydopamine-treated hemiparkinsonian rat brain, *J. Pharmacol. Sci.*, **102**, 243-247, doi: 10.1254/jphs.sc0060098.
90. Kim, S. J., Park, Y. J., and Oh, Y. J. (2012) Proteomic analysis reveals a protective role for DJ-1 during 6-hydroxydopamine-induced cell death, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **422**, 8-14, doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.063.
91. Batelli, S., Invernizzi, R. W., Negro, A., Calcagno, E., Rodilossi, S., et al. (2015) The Parkinson's disease-related protein DJ-1 protects dopaminergic neurons *in vivo* and cultured cells from alpha-synuclein and 6-hydroxydopamine toxicity, *Neurodegener. Dis.*, **15**, 13-23.
92. Lev, N., Barhum, Y., Ben-Zur, T., Aharoni, I., Trifonov, L., et al. (2015) A DJ-1 based peptide attenuates dopaminergic degeneration in mice models of Parkinson's disease via enhancing Nrf2, *PLoS One*, **10**, e0127549, doi: 10.1371/journal.pone.0127549.
93. Miyazaki, S., Yanagida, T., Nunome, K., Ishikawa, S., Inden, M., et al. (2008) DJ-1-binding compounds prevent oxidative stress-induced cell death and movement defect in Parkinson's disease model rats, *J. Neurochem.*, **105**, 2418-2434.
94. Yanagisawa, D., Kitamura, Y., Inden, M., Takata, K., Taniguchi, T., et al. (2008) DJ-1 protects against neurodegeneration caused by focal cerebral ischemia and reperfusion in rats, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **28**, 563-578.
95. Yamane, K., Kitamura, Y., Yanagida, T., Takata, K., Yanagisawa, D., et al. (2009) Oxidative neurodegeneration is prevented by UCP0045037, an allosteric modulator for the reduced form of DJ-1, a wild-type of familial Parkinson's disease-linked PARK7, *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, 4789-4804, doi: 10.3390/ijms10114789.
96. Takahashi-Niki, K., Inafune, A., Michitani, N., Hatakeyama, Y., Suzuki, K., et al. (2015) DJ-1-dependent protective activity of DJ-1-binding compound no. 23 against neuronal cell death in MPTP-treated mouse model of Parkinson's disease, *J. Pharmacol. Sci.*, **127**, 305-310, doi: 10.1016/j.jphs.2015.01.010.
97. Tashiro, S., Caaveiro, J., Nakakido, M., Tanabe, A., Nagatoishi, S., et al. (2018) Discovery and optimization of inhibitors of the Parkinson's disease associated protein DJ-1, *ACS Chem. Biol.*, **13**, 2783-2793, doi: 10.1021/acscchembio.8b00701.
98. Medvedev, A., Buneeva, O., Gnedenko, O., Ershov, P., and Ivanov, A. (2018) Isatin, an endogenous nonpeptide biofactor: a review of its molecular targets, mechanisms of actions, and their biomedical implications, *Biofactors*, **44**, 95-108, doi: 10.1002/biof.1408.
99. Medvedev, A., Kopylov, A., Buneeva, O., Kurbatov, L., Tikhonova, O., et al. (2020) A neuroprotective dose of isatin causes multilevel changes involving the brain proteome: prospects for further research, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4187, doi: 10.3390/ijms21114187.
100. Medvedev, A., Buneeva, O., Gnedenko, O., Fedchenko, V., Medvedeva, M., et al. (2006) Isatin interaction with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, a putative target of neuroprotective drugs: partial agonism with deprenyl, *J. Neural Transm. Suppl.*, **71**, 195-203.
101. Buneeva, O. A., Kapitsa, I. G., Ivanova, E. A., Kopylov, A. T., Zgodina, V. G., and Medvedev, A. E. (2020) The effect of a neuroprotective dose of isatin or deprenyl to mice on the profile of brain isatin-binding proteins, *Biochemistry (Moscow), Suppl. Ser. B Biomed. Chem.*, **14**, 116-126.
102. Drechsel, J., Mandl, F. A., and Sieber, S. A. (2018) Chemical probe to monitor the parkinsonism-associated protein DJ-1 in live cells, *ACS Chem. Biol.*, **13**, 2016-2019.

## DJ-1 PROTEIN AND ITS ROLE IN THE DEVELOPMENT OF PARKINSON'S DISEASE: STUDIES ON EXPERIMENTAL MODELS

### Review

O. A. Buneeva and A. E. Medvedev\*

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

DJ-1, also known as Parkinson's disease protein 7, is a multifunctional protein ubiquitously expressed in cells and tissues. Interacting with proteins of various intracellular compartments, DJ-1 plays an important role in maintaining different cellular functions. Mutant DJ-1 forms containing amino acid substitutions (especially L166P), typical of Parkinson's disease, are characterized by impaired dimerization, stability, and folding. DJ-1 exhibits several types of catalytic activity; however, in the enzyme classification it exists as protein deglycase (EC 3.5.1.124). Apparently, in different cell compartments DJ-1 exhibits catalytic and non-catalytic functions, and their ratio still remains unknown. Oxidative stress promotes dissociation of cytoplasmic DJ-1 dimers into monomers, which are translocated to the nucleus, where this protein acts as a coactivator of various signaling pathways, preventing cell death. In mitochondria, DJ-1 is found in the synthasome, where it interacts with the  $\beta$  ATP synthase subunit. Downregulation of the *DJ-1* gene under conditions of experimental PD increases sensitivity of the cells to neurotoxins, and introduction of the recombinant DJ-1 protein attenuates manifestation of this pathology. The thirteen-membered fragment of the DJ-1 amino acid sequence attached to the heptapeptide of the TAT protein penetrating into the cells exhibited neuroprotective properties in various PD models both in cell cultures and after administration to animals. Low molecular weight DJ-1 ligands also demonstrate therapeutic potential, providing neuroprotective effects seen during their incubation with cells and administration to animals.

**Keywords:** DJ-1 protein, structure and function, catalytic activity, pathogenic mutations, Parkinson's disease, experimental models, DJ-1 ligands

## АССОЦИИРОВАННЫЕ СО СТРЕССОМ ГИППОКАМПАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ОБЩИЕ ДЛЯ ЭПИЛЕПСИИ И КОМОРБИДНЫХ ДЕПРЕССИВНЫХ РАССТРОЙСТВ

### Обзор

© 2021 Н.В. Гуляева<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, 117485 Москва, Россия; электронная почта: nata\_gul@ihna.ru*

<sup>2</sup> *Научно-практический психоневрологический центр имени З.П. Соловьева, 115419 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 24.02.2021

После доработки 30.03.2021

Принята к публикации 30.03.2021

В обзоре рассматриваются молекулярно-клеточные механизмы, общие для эпилептических и депрессивных расстройств. Коморбидные эпилепсия височной доли и депрессия ассоциированы с нарушениями функционирования гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальной оси и вызванными избытком глюкокортикоидов нарушениями функции и структуры гиппокампа, ключевого региона мозга для обучения/памяти и эмоций. Селективная чувствительность гиппокампа к стрессу, опосредованная рецепцией секретируемых при стрессе глюкокортикоидных гормонов, является «ценой» высокой функциональной пластичности и плейотропности этой лимбической структуры. Общие молекулярно-клеточные механизмы включают нарушения функции глюкокортикоидных рецепторов, нейротрансмиттерных систем, нейротрофических факторов и развитие нейровоспаления, приводящие к нейродегенерации и гибели нейронов гиппокампа. Наряду с этим происходит нарушение нейрогенеза в субгранулярной нейрогенной нише и формирование aberrantных нейронных сетей. Эти глюкокортикоид-зависимые процессы лежат в основе измененной стресс-реактивности и развития ассоциированных с хроническим стрессом коморбидных патологий, в частности височной эпилепсии и депрессивных расстройств.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** эпилепсия, эпилепсия височной доли, депрессия, гиппокамп, глюкокортикоиды, стресс, нейровоспаление, гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальная ось, нейрогенез, нейронные сети.

DOI: 10.31857/S0320972521060038

### ВВЕДЕНИЕ

Эпилепсия является одним из самых распространенных неврологических заболеваний, от которого в мире страдает около 70 млн человек. Оно характеризуется периодическими спонтанными судорогами, обусловленными гипервозбудимостью и гиперсинхронизацией нейронов мозга. Эпилептические расстройства ассоциированы с различными этиологическими факторами – генетическими, инфекционными, травматическими, сосудистыми, токсическими, опухолевыми и др. Почти у трети пациентов эпилепсия фармакорезистентна. Эпилептический мозг является примером хронического нарушения нейропластичности (функциональных

и структурных изменений в мозге, позволяющих адаптироваться к условиям внешней среды, обучаться, запоминать информацию, а также восстанавливать мозг после повреждения), в основе которой лежат биохимические процессы в синапсах и других компартментах нейронов [1].

Эпилепсия характеризуется судорожными припадками, но также часто может быть ассоциирована с коморбидными когнитивными и психическими расстройствами [2]. Распространенность сопутствующих психических заболеваний у пациентов с эпилепсией относительно высока: каждый третий пациент в течение своей жизни испытывал психическое расстройство, как правило, расстройства настроения и тревожность. Психические коморбидные заболевания часто предшествуют возникновению судорожного расстройства и влияют на качество жизни пациентов и течение эпилепсии в нескольких аспектах. В частности, это худшая переносимость фармакотерапии противоэпилептически-

Принятые сокращения: BDNF – нейротрофический фактор мозга; ГГКС – гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальная система (ось); ГК – глюкокортикоиды; ГР – глюкокортикоидные рецепторы; ЭВД – эпилепсия височной доли.

ми препаратами, развитие ятрогенных психиатрических симптомов от фармакологического и хирургического лечения, повышенный риск смертности и увеличение экономического бремени для пациента, семьи и общества в целом. Важность проблемы такова, что идет обсуждение среди специалистов, не следует ли включить сопутствующие психиатрические заболевания в классификацию эпилепсий [3].

Депрессия — одно из наиболее инвалидизирующих из сопутствующих эпилепсии заболеваний, она оказывает глубокое негативное влияние на качество жизни пациентов с эпилепсией. Связь между депрессией и эпилепсией, известная с древних времен, до настоящего времени до конца не изучена. Долгое время депрессивные расстройства рассматривались только как выражение реактивного процесса на стрессорные факторы существования больного эпилепсией. Однако эпилепсия и сопутствующие психические заболевания имеют сложную взаимозависимость, которая может проявляться как их высокой коморбидностью, так и наличием двунаправленной связи, в результате чего не только люди с эпилепсией подвергаются большому риску развития психических расстройств, но и пациенты с первичными психическими расстройствами подвергаются более высокому риску развития эпилепсии [4]. Такая связь может быть объяснена только наличием общих патогенетических механизмов этих заболеваний. Действительно, полученные за последние три десятилетия данные продемонстрировали общие для эпилепсии и депрессии биохимические, нейрорепатологические и нейрофизиологические изменения. Они подтверждены исследованиями на животных моделях и опосредуют как развитие расстройств настроения, так и развитие судорожной активности.

Среди множества различных форм эпилепсии наиболее распространенным эпилептическим синдромом у взрослых является эпилепсия височной доли (ЭВД). По разным данным от 30 до 70% пациентов с ЭВД имеют нервно-психические осложнения, наиболее часто это расстройства депрессивного спектра. Коморбидные расстройства настроения у пациентов с ЭВД включают расстройства личности (особенно обсессивно-компульсивные расстройства) и «большую» депрессию (major depressive disorder), наиболее часто проявляющиеся при фармакорезистентной (лекарственно-устойчивой, рефрактерной) ЭВД с гиппокампальным (мезиальным височным) склерозом [5, 6]. Частота депрессии колеблется от 20 до 55% у пациентов с рефрактерной эпилепсией, большинство которых составляют пациенты с ЭВД, ассоциированной со

склерозом гиппокампа. Для пациентов с рефрактерной эпилепсией характерна высокая частота дисфункциональных личностных паттернов, различающихся в зависимости от эпилептогенной зоны [7, 8]. Интересно, что к факторам риска коморбидной депрессии при ЭВД, помимо фармакорезистентности, относится и пол: женщины страдают чаще, что в целом характерно для депрессивных расстройств [9].

### **ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ КОНЦЕПЦИЯ КОМОРБИДНОСТИ ЭПИЛЕПСИИ И ДЕПРЕССИИ**

Существование общих патогенетических механизмов при первичных психических расстройствах и эпилепсии было постулировано в качестве одной из ведущих гипотез для объяснения их тесной взаимосвязи. Для проверки этой гипотезы применяют анализ нейробиологических характеристик расстройств настроения и эпилепсии [4]. На животных моделях были получены данные о том, как нейробиологические аспекты расстройств настроения могут индуцировать эпилептогенный процесс. Анализ этих данных помогает объяснить повышенный риск развития эпилепсии, в частности фармакорезистентной ЭВД, у пациентов с первичными расстройствами настроения. Указанные исследования подтверждают существование общих патогенетических механизмов, функционирующих как при депрессивных и, вероятно, тревожных расстройствах, так и при эпилепсии, и могут объяснить их относительно высокую коморбидность, двунаправленную связь и худшее течение судорожного расстройства, связанного с предшествующим анамнезом депрессии [2, 4]. Авторы этого анализа справедливо отмечают, что имеющиеся данные представляют собой лишь вершину айсберга, а исследования в этой области только начинаются.

При изучении моделей эпилепсии на животных депрессивно-подобное поведение отчаяния (неподвижность в тесте принудительного плавания) и ангедония (отсутствие предпочтения подслащенной воды) были описаны на модели абсансной эпилепсии (линия крыс WAG/Rij), а также на моделях ЭВД. Литий-пилокарпиновая модель эпилептического статуса с последующим периодом эпилептогенеза в течение нескольких недель является одной из наиболее адекватных моделей ЭВД. У животных при этом наблюдаются повреждения мозга, в первую очередь гиппокампа, и изменения нейропластичности, напоминающие таковые при ЭВД у человека. Обе модели эпилепсии вызывают развитие поведен-

ческих симптомов отчаяния, ангедонию и изменения в серотонинергических путях гиппокампа [10], а также ряд других биохимических изменений. Эти изменения непосредственно или опосредованно затрагивают гиппокамп, включая избыточную активацию гипоталамо-гипофизарно-адренортикотикальной системы (ГТАКС) и провоспалительные процессы.

### ЭПИЛЕПСИЯ КАК МОДЕЛЬ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА

Депрессивные расстройства относят к стресс-зависимым заболеваниям, для которых ключевая роль различных стрессорных факторов (в т.ч. стресса в раннем возрасте и хронического стресса) и нарушения стресс-реактивности в патогенезе заболевания подтверждена многочисленными экспериментальными [11–14] и клиническими данными [15–20]. Однако роли стрессорных факторов в эпилептогенезе и при эпилепсии уделяется значительно меньше внимания. Результаты клинических исследований, а также данные животных моделей о роли стрессорных факторов в патогенезе эпилепсии свидетельствуют о том, что стресс является важным фактором развития эпилепсии путем ряда механизмов, а само заболевание может быть рассмотрено как модель хронического стресса.

Гормоны стресса глюкокортикоиды (ГК – кортизол у человека и кортикостерон у лабораторных грызунов), секретируемые в кровь в результате функционирования ГТАКС, оказывают непрерывное действие на мозг. Естественные изменения их уровней происходят в результате ультрадианных или циркадианных ритмов и в стрессогенных ситуациях [21]. Клетки мозга экспрессируют два типа кортикостероидных рецепторов, глюкокортикоидные (ГР) и минералокортикоидные (МР), различающиеся по региональному распределению и аффинности. Эти рецепторы опосредуют как быстрые негеномные, так и более медленные геномные эффекты в нейронах (мембранные и цитоплазматические кортикостероидные рецепторы соответственно). Именно поэтому естественные, в частности вызванные стрессом, сдвиги в уровне ГК ассоциированы со сложным временным и регионарным паттерном нейронной активности. Изменения активности клеток мозга и соответствующих нейронных сетей приводят к когнитивным и эмоциональным сдвигам [22]. Непосредственно после стресса на пике концентрации ГК повышается активность областей мозга, вовлеченных в эмоциональные ответы, а в последующий период – в высшие когнитивные функции. Гип-

покамп, структура лимбической системы с максимальной плотностью кортикостероидных рецепторов, является важной как для когнитивной функции (дорсальный/задний гиппокамп), так и для эмоциональной сферы (вентральный/передний гиппокамп). Соответственно, именно регуляция функции гиппокампа гормонами стресса становится ключевой для реакции организма на стресс [21, 23]. Важно также, что в отличие от других структур мозга, в гиппокампе базальная мембрана покрывает только 30% поверхности сосудов [24], что облегчает доставку гормонов в нейроны. Сбалансированный ответ в обеих фазах острого стресса, на пике ГК и при последующем снижении их уровня, необходим для преодоления стресса. Однако при хроническом стрессе этот баланс нарушается, особенно у генетически уязвимых индивидов, и это приводит к усилению проявления заболевания. Это касается и психических расстройств, и неврологических заболеваний, в частности эпилепсии. Как системы стресс-реактивности, так и судорожная активность существенно зависят от эндогенных нейростероидов, обладающих важной нейрофизиологической активностью. Нейростероиды взаимодействуют с глутамат-, серотонин-, адрен- и ГАМКергическими системами, потенциал-зависимыми катионными и анионными каналами, системами нейротрофинов и др. Нарушения уровней нейростероидов ассоциированы с нейровоспалением и стресс-индуцированными заболеваниями, а также депрессией и эпилепсией [25].

К настоящему времени стало очевидным, что факторы стресса являются ключевыми в патогенезе эпилепсии на ранних ее стадиях. Судорожная активность является одним из последствий раннего стресса; и хотя лежащие в основе этого феномена механизмы остаются малоизученными, имеются свидетельства вовлеченности в этот процесс глутамат-, ГАМК- и адренергической систем [26].

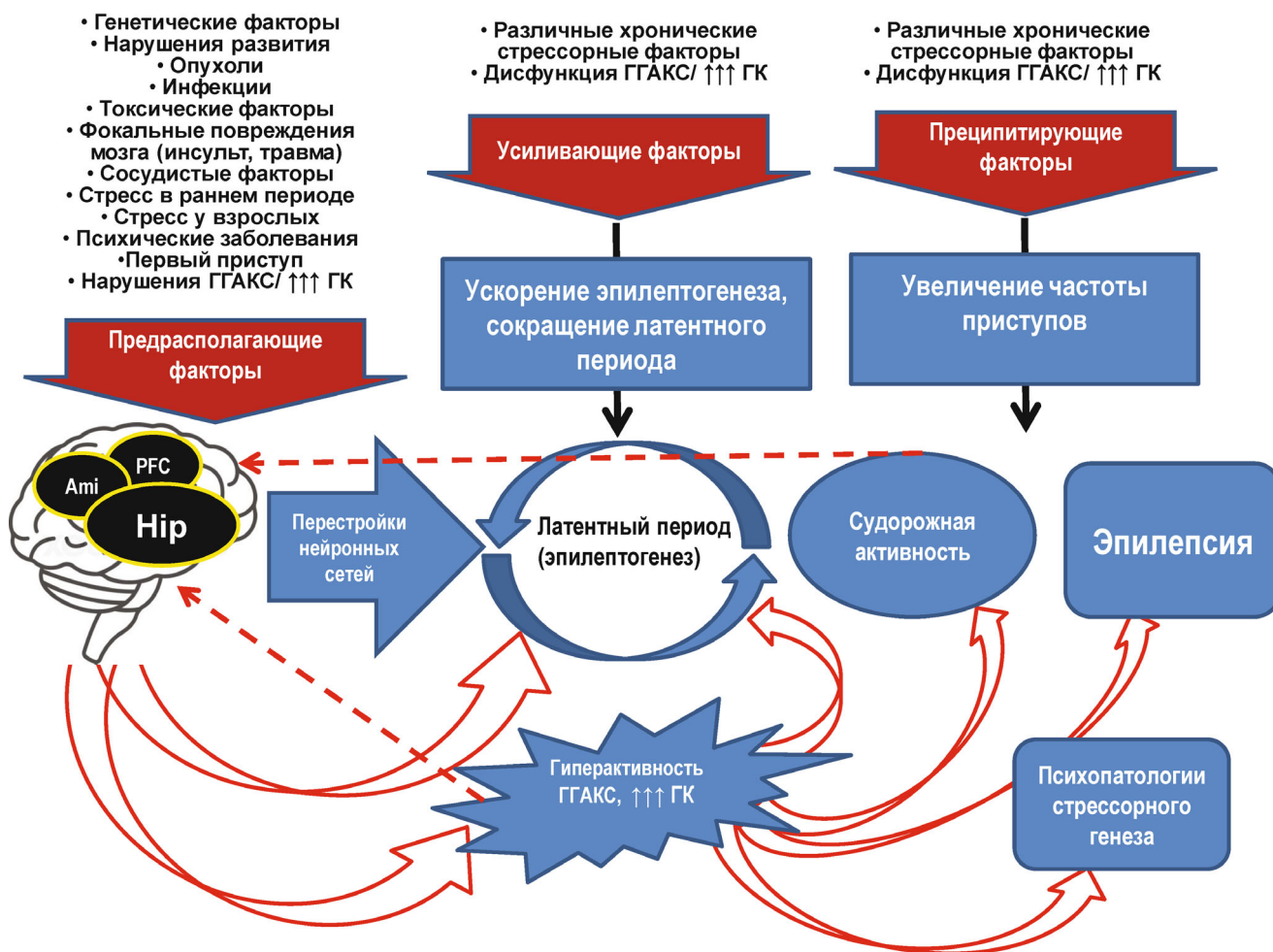
Для исследования ассоциации эпилепсии и стресса у пациентов используется несколько подходов. При опросе пациенты с эпилепсией зачастую сообщают, что именно стрессорные события запускают у них судорожные приступы. Тем не менее доклинические, эпидемиологические и клинические исследования связи стресса с эпилепсией дают довольно противоречивые результаты. Экспериментальные результаты большинства доклинических исследований подтверждают, что хронический стресс усугубляет проявления эпилепсии, а в некоторых случаях может служить ее причиной [27, 28], однако данные клинических исследований не так однозначны. Негативное влияние депрессии на

контроль судорожных расстройств было задокументировано в различных исследованиях [29]. У большинства пациентов с эпилепсией, которые отмечают стресс как индуктор приступов, обнаруживаются тревожность, депрессия или детская травма в анамнезе, в отличие от тех, которые не считают стресс важным фактором начала приступов. При этом большинство пациентов со стресс-индуцированными судорогами, использующих методы снижения уровня стресса для облегчения приступов, считают этот подход эффективным [30]. Несмотря на то что механизмы проэпилептических эффектов стресса до сих пор остаются недостаточно изученными, вероятно, для целей формализации анализа биологических механизмов патогенеза эпилепсии ее целесообразно рассматривать как модель хронического стресса.

Медиаторы стресса, гормоны и нейротрансмиттеры связываются с рецепторами в различных структурах мозга, и в первую очередь в гиппокампе, чувствительном к стрессу и легко развивающем судорожную активность. Взаимодействие медиаторов стресса с рецепторами в гиппокампе влияет на возбудимость отдельных нейронов и нервных сетей. Важно, что в зависимости от многих факторов медиаторы демонстрируют уникальные пространственно-временные профили, определяющие природу сложных комбинаторных эффектов на возбудимость сетей гиппокампа и генерацию судорог [31]. Несмотря на многочисленные клинические свидетельства того, что стресс может быть триггерным фактором развития приступов у пациентов с эпилепсией, у этих пациентов мало изучено состояние ГПАКС, определяющее стресс-реактивность. Невзирая на существенный разброс данных, который может быть отчасти связан с приемом противоэпилептических препаратов, в большинстве исследований выявлены ассоциации приступов с усилением стрессорной нагрузки и повышением уровня кортизола [32]. При этом высокая частота приступов ассоциирована с повышением уровнем кортизола и более низкой функциональной коннективностью мозга. Выраженность психологического дистресса, реализованная в первую очередь в депрессивных и тревожных расстройствах, при эпилепсии существенно выше, чем при многих других заболеваниях. Ряд исследователей предполагает, что эти коморбидные состояния вносят даже больший вклад в ухудшение качества жизни пациентов, чем сама эпилепсия [33]. Очевидно, что нейробиологическая связь между психиатрическими расстройствами и эпилепсией в существенной степени опосредована стрессом, вовлеченным в психо- и патофизиологические механизмы.

Как было указано выше, наиболее частой коморбидностью эпилепсии являются депрессивные эпизоды, встречаемость которых, в зависимости от исследуемых когорт, может превышать 50% [34]. Депрессия относится к заболеваниям, в основе патогенеза которых лежит неспособность пациента адекватно справляться со стрессорными нагрузками. Проявления депрессии при эпилепсии включают много взаимодействующих нейробиологических и психосоциальных детерминант, в т.ч. клинические проявления эпилепсии (частоту и тип приступов, источник и его латерализацию), нейрохимические и ятрогенные механизмы. Наиболее понятным и реалистичным (хотя лишь частичным) объяснением депрессивной симптоматики при эпилепсии является тот факт, что больной находится под действием хронического мультифакторного стресса. Неопределенность и непредсказуемость приступов вызывает чувства уныния, одиночества, отчаяния, низкую самооценку и самоупреки, что может привести к социальной изоляции, социальной стигматизации и бессилию. Депрессия часто рассматривается как реакция на социальную стигму и связанное с ней пониженное качество жизни, а частота депрессии и суицидальности у пациентов с эпилепсией в 4–5 раз выше, чем в здоровой популяции [35]. Симптомы тревожности также часто ассоциированы с эпилепсией, хотя в целом независимы от приступов. Нередко они проявляются перииктально («около» судорожного приступа) и классифицируются в соответствии с этим на преиктальные, иктальные и постиктальные, хотя, как полагают, в целом происходят независимо от приступов. Как и в случае депрессии, отмечается двусторонняя патофизиологическая связь между тревожным расстройством и эпилепсией. У некоторых пациентов тревога инициирует приступы; для понимания и объяснения этого феномена используют концепции стресса и возбуждения (arousal) [36]. Приступы, источник которых находится в лимбических сетях, включающих амигдалу, могут иметь симптоматику, связанную со страхом.

Анализ имеющихся к настоящему времени данных свидетельствует о том, что факторы стресса, действующие в раннем онтогенезе или на взрослый организм, могут являться эпилептогенными и инициировать развитие эпилепсии. Эти факторы могут быть хроническими и действовать при эпилептогенезе и развившемся заболевании, либо однократно, запуская молекулярные процессы, лежащие в основе эпилепсии и коморбидной депрессии (подробно рассмотрены в статьях [27, 37, 38]). На пациента с эпилепсией действует целый комплекс хрониче-



**Рис. 1.** Общие факторы развития эпилепсии и коморбидной психопатологии. Указаны группы факторов, предрасполагающих и усиливающих эпилептогенез, а также преципитирующих судорожные приступы. Схема составлена на основании данных, приведенных в работах [27, 29, 37, 40]. ГК – глюкокортикоиды; ГТАКС – гипоталамо-гипофизарно-адренкортикальная система; Ami – амигдала; Hip – гиппокамп; PFC – префронтальная кора. (С цветными вариантами рисунков можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

ческих стрессорных факторов, психологических и физических. По сути, коморбидные эпилепсии, депрессивные и тревожные расстройства и подтверждают хронизацию неизбежного стресса. Представление об эпилепсии как модели хронического стресса схематически отражено на рисунке 1, где приведены стрессорные проэпилептические факторы, действующие в разные периоды развития эпилепсии. Также показана их потенциальная связь с развитием психопатологии: указаны группы предрасполагающих, усиливающих эпилептогенез и преципитирующих судорожные приступы факторов. При этом устойчивые нарушения ГТАКС представляются ключевыми в развитии коморбидных эпилепсии и депрессии. Вначале это избыточная активация системы, затем, на стадии хронической депрессии, наступает истощение ГТАКС [39].

При неконтролируемом хроническом стрессе гиперкортизолемиа (в экспериментах на животных – гиперкортикостеронемия) становится важнейшим компонентом при формировании порочного круга коморбидности эпилепсии и депрессии, в основе которого лежат стрессорные и нейрогуморальные факторы [41]. Следствием развивающихся на фоне дисфункции ГТАКС коморбидных депрессии и ЭВД становится усиление действия взаимно потенцирующих хронических стрессорных факторов, в качестве которых начинают выступать и сами заболевания, в частности осознание пациентом своего состояния. В основе такого порочного круга лежит тот факт, что ГТАКС контролирует как стрессорный ответ, так и судорожную активность, потому что гормоны стресса, в первую очередь ГК, влияют и на возбудимость нейро-



**Рис. 2.** Порочный круг коморбидности эпилепсии и депрессии, в основе которого лежат стрессорные и нейрогуморальные факторы. Следствия развивающихся на фоне дисфункции ГГКС коморбидных депрессии и ЭВД представляют собой взаимно усиливающие коморбидную патологию стрессорные факторы, образующие порочный круг и способствующие развитию и усугублению обоих заболеваний. Хронический стресс (в т.ч. ассоциированный с эпилепсией) приводит к дисфункции ГГКС, что в свою очередь вызывает нарушение стресс-реактивности, углубляя эту дисфункцию, результатом которой является развитие депрессивного расстройства. Развитие депрессии, в свою очередь, усиливает дисфункцию ГГКС, выступая в качестве дополнительного хронического стрессорного фактора для пациента. При этом стресс посредством механизмов разного уровня приводит к запуску судорожных приступов и увеличению их частоты. Утяжеление эпилепсии также ассоциировано с усилением хронического стресса и коморбидной депрессии

нов, и на их чувствительность к судорожной активности [42, 43] (рис. 2).

### ГИППОКАМПАЛЬНЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ ЭВД, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ КОМОРБИДНОСТИ ЭПИЛЕПСИИ И ДЕПРЕССИИ

**Стадийность изменений нейропластичности в гиппокампе при ЭВД.** На примере ЭВД, наиболее распространенной и изученной формы эпилепсии у взрослых, затрагивающей структуру и функционирование гиппокампа, можно про-

следить стадийность изменений нейропластичности. Основными фазами, противоположными по направлению, являются активный эпилептогенез и стадия сформировавшейся ЭВД [44–46]. В период эпилептогенеза происходят события, приводящие к формированию эпилептических нейронных сетей и соответствующей коннектопатии. Это изменения глутаматергических и ГАМКергических нейронов (рис. 3), усиление aberrантного нейрогенеза, аксональный спрутинг и ремоделирование дендритов, в частности за счет избыточного усиления системы нейротрофического фактора мозга (BDNF, brain derived neurotrophic factor) в специфических областях гиппокампа. По мере развития эпилептогенеза



эта стадия аберрантной суперпластичности сменяется формированием эпилептогенного очага, функционирование которого сопровождается противоположными событиями, приводящими к ограничению пластичности: истощением системы BDNF, нейровоспалением, повреждением аксонов, нейродегенерацией, гибелью нейронов, склерозом гиппокампа, подавлением субгранулярного нейрогенеза (рис. 3).

**Центральная роль ГГКС в коморбидности эпилепсии и депрессии.** Перестройка синаптических связей и нейронных сетей в процессе эпилептогенеза в значительной степени инициируется нарушениями ГГКС. Контроль большинства ключевых механизмов, опосредующих эпилептогенез и формирование зрелых эпилептических сетей при ЭВД, нарушается

также и при депрессивных расстройствах, которые, как правило, также связаны с дисфункцией ГГКС. Другие общие механизмы, включая истощение BDNF, активацию микроглии, нейровоспаление, нарушение нейрогенеза и нейродегенерацию [40, 48], изменения в нейромедиаторных системах (глутамат-, серотонин-, моноамин- и ГАМКергической) [49], часто также связаны с ГГКС прямо или опосредованно.

Исследования последних лет подтверждают наличие гиперактивной ГГКС и повышенного уровня ГК у пациентов с ЭВД. Избыток ГК стимулирует возбудимость нейронов, эпилептиформную активность и предрасположенность к припадкам. Пациенты с ЭВД могут проявлять аномальные реакции на стресс, облегчающие раз-

### ЭПИЛЕПТОГЕНЕЗ (ЛАТЕНТНЫЙ ПЕРИОД): модификация синхронизированных ритмических разрядов нейронных ансамблей и сетей путем изменения синаптических и нейронных связей

- Изменения глутаматных рецепторов («аберрантные рецепторы») и глутаматергических нейронов, формирование избытка возбуждающих механизмов
- Изменения рецепторов ГАМК и ГАМКергических нейронов; формирование дефицита тормозных механизмов
- Образование новых аберрантных и эктопических синапсов → возрастание синаптической эффективности → молекулярные сигнальные каскады → аксональный спрутинг и ремоделирование дендритов
- Локальный избыток BDNF в гиппокампе → усиленный аберрантный нейрогенез, эктопическая миграция новых нейронов → образование новых сетей
- Изменения функционирования микроглии, астроцитов, клеток эндотелия, внеклеточного матрикса
- Развитие нейровоспаления на данном этапе частично ограничено высоким уровнем BDNF
- Эпигенетические продолжительные изменения транскрипции генов, модификация структуры хроматина вследствие судорожной активности

### ЗРЕЛЫЕ ЭПИЛЕПТИЧЕСКИЕ СЕТИ: рекуррентная судорожная активность, нейродегенерация

В результате эпилептогенеза формируются нейронные сети с избыточным процессом возбуждения, недостаточностью тормозных процессов и недостаточностью нейротрофических механизмов.

- Нарушения ГГКС → патологическая регуляция глутаматных синапсов через рецепторы ГК → гиперглутаматергическая нейротрансмиссия → эксайтотоксичность
- Подавление системы BDNF в гиппокампе
- Нейровоспаление
- Повреждение аксонов
- Нейродегенерация и гибель нейронов
- Склероз гиппокампа
- Астроглиоз
- Подавление нейрогенеза в субгранулярной нейрогенной нише

**Рис. 3.** Схематическое представление молекулярно-клеточных гиппокампальных механизмов основных стадий патогенеза ЭВД [44–47]. По мере развития ЭВД в процессе эпилептогенеза на фоне избытка BDNF и усиления нейрогенеза в субгранулярной зоне зубчатой извилины формируется «аберрантная суперпластичность» и происходит созревание эпилептических нейронных сетей. Затем на фоне дисфункции ГГКС (избытка ГК и нарушения функционирования глюкокортикоидных и минералокортикоидных рецепторов) «гиперглутаматергический» сигналинг и активация нейровоспаления приводят к подавлению нейрогенеза, нейродегенерации и гибели нейронов, что существенно снижает пластичность гиппокампа; этот процесс усугубляется в результате рекуррентной судорожной активности

вите приступа и повышающие вероятность коморбидных психопатологий [37, 50]. Гиперактивность ГГКС отрицательно влияет на структуру и функцию височной доли мозга, значительно вовлеченной и в ЭВД, и в расстройства настроения. ГК через свои рецепторы на мембранах и в цитоплазме глутаматергических синапсов могут нарушать глутаматергическую трансмиссию (подробнее в обзоре [51]). Избыточная возбуждающая активность нейронов, сопровождающая судорожные приступы, повреждает структуры височных долей, еще больше растормаживая ГГКС [43]. Гиппокамп особенно чувствителен к хроническому стрессу и действию ГК [41]. Эти факторы вызывают, в частности, ретракцию дендритов — обратимую форму пластичности, которая включает реструктуризацию дендритов. При ретракции дендритов, которая может сохраняться в течение недель, месяцев или даже лет, вероятность повреждения гиппокампа увеличивается. Наличие такого «временного окна» является одним из постулатов «гипотезы уязвимости гиппокампа для ГК» [52].

Дисфункция ГГКС при эпилепсии требует более подробного механистического изучения, потому что именно она является ключом к пониманию развития и прогрессирования ЭВД и коморбидных патологий, а также потенциальной мишенью для терапии. Мета-анализ соотношения уровня кортизола и судорог у пациентов с эпилепсией был проведен в работе Сапо-Лópez et al. [32] по данным 38 статей, в 14 из которых был проведен анализ базального уровня кортизола, в 8 — исследовалось влияние противосудорожных препаратов, в 13 — оценивались эффекты судорог на уровень кортизола, в 3 — влияние стресса на этот показатель. Базальный кортизол у пациентов оказался выше по сравнению с популяцией в исследованиях с наиболее гомогенными группами (45% из 38). Несмотря на гетерогенность данных по влиянию противосудорожных препаратов, судороги были ассоциированы с повышением уровня кортизола в 77% исследований. Единственная работа с предъявлением острого стресса показала более высокую реактивность кортизола при эпилепсии в сравнении с контролем [32]. В исследованиях с самооценкой стресса пациентами более высокая частота приступов была ассоциирована с повышенными уровнями кортизола и сниженной функциональной коннективностью мозга. Суточный ритм эпилептических приступов при разных типах эпилепсии сходен с циркадианным ритмом кортизола, и эти результаты подтверждают гипотезу зависимости приступов от уровня ГК [53, 54].

В гиппокампе пациентов с фармакорезистентной ЭВД и коморбидной депрессией обнаружено снижение плотности ГР [55]. Экспрессию ГР оценивали иммуногистохимически у пациентов с ЭВД, перенесших нейрохирургическую операцию по поводу фармакорезистентной эпилепсии, а также у контрольной группы (аутопсия). В контрольных образцах выявлена высокая плотность ГР в гранулярных нейронах зубчатой извилины и пирамидных клетках CA1, в то время как экспрессия ГР у пациентов с ЭВД была снижена, особенно при наличии депрессии. Соотношение между числом клеток ГР+/NeuN+ и экспрессия ГР в глиальных клетках были ниже у пациентов с коморбидными ЭВД и депрессией в сравнении с ЭВД и отрицательно коррелировали с тяжестью депрессии, оцененной по психиатрическому анамнезу. Таким образом, снижение экспрессии ГР в гиппокампе может быть вовлечено в этиологию депрессии у пациентов с ЭВД [55].

Клинические данные свидетельствуют о том, что усиленная нейроэндокринная реакция на стресс у пациентов с ЭВД имеет хронический характер, потенциально способствуя как прогрессированию заболевания, так и развитию сопутствующей психопатологии. Не вполне ясно, отражают нарушения ГГКС прямые эффекты эпилептической патологии или вторичные эффекты бремени болезни, в частности социальное отчуждение, стигматизацию и другие типы хронического стресса, сопутствующего эпилепсии. Моделирование на животных дает возможность разделить эти факторы для оценки воспроизведения нейроэндокринных и поведенческих изменений, характерных для эпилепсии человека. В работе Wulsin et al. [56] на самцах мышей линии FVB моделировали ЭВД при помощи пилокарпина, который вызывал эпилептический статус и последующее развитие спонтанных рецидивирующих приступов. Базальные уровни кортикостерона были повышены у мышей, получавших пилокарпин, через 1, 7 и 10 недель после эписудуса по сравнению с контрольной группой. Мыши с эпилепсией имели увеличенный вес надпочечников и гиперсекрецию кортикостерона после острого мобилизационного стресса. Животные в модели ЭВД демонстрировали усиленное ангедоническое поведение (показатель депрессивно-подобного фенотипа), гиперактивность и тревожность. Таким образом, при моделировании ЭВД на мышцах развивается гиперактивность ГГКС и депрессивно-подобное поведение. Эпилептический статус индуцирует быструю гиперактивацию ГГКС, а дисфункция этой оси может усугублять вызванное судорожным приступом

повреждение головного мозга. На той же модели ЭВД было показано, что введение животным антагониста ГР RU486 блокирует вызванное пилоткарпин-индуцированным эпистатусом повышение уровня кортизола [57]. RU486 также препятствовал развитию патологических изменений гиппокампа, включая потерю мшистых клеток хилуса и патологическую пролиферацию клеток в зубчатой фасции. Интересно, что потеря мшистых клеток и накопление эктопических новообразованных клеток в хилусе положительно коррелировали с тяжестью судорожных приступов, что позволяет предположить существование потенциального антиэпилептогенного эффекта антагонистов ГК [57]. С использованием другой модели ЭВД, пентилентетразолового киндлинга (процесса, при котором повторные введения подпороговых доз конвульсанта приводили к развитию судорожной активности), мы ранее показали, что даже однократный судорожный приступ вызывает постепенное ухудшение функций обучения и памяти в гиппокамп-зависимых тестах [58]. По-видимому, кортикоид-зависимый механизм повреждения гиппокампа может лежать и в основе когнитивных нарушений, описанных у пациентов с ЭВД.

**Изменения нейрогенеза.** Практически у всех млекопитающих, включая человека, на протяжении всей жизни в гиппокампе реализуется нейрогенез. Многочисленные исследования на животных моделях показывают, что нейрогенез в субгранулярной нише (зубчатой извилине гиппокампа) важен для таких функций мозга, как обучение, память и эмоции, при этом вновь образованные нейроны потенциально более возбудимы, чем «старые». Нейрогенез в гиппокампе взрослого мозга очень чувствителен к физиологическим и патологическим раздражителям. При этом ключевым механизмом влияния стрессорных событий на нейрогенез является его модуляция посредством ГК [59, 60]. Судорожные приступы влияют на нейрогенез как количественно, так и качественно [61]. Острые приступы, как правило, ассоциируются с усилением нейрогенеза и миграцией новорожденных нейронов в эктопические области, такие как хилус и молекулярный слой зубчатой извилины. Аномально (эктопически) мигрирующие новорожденные нейроны, формирующиеся в результате острых приступов, эпилептического статуса или черепно-мозговой травмы, принимают участие в создании эпилептогенных нейронных сетей гиппокампа [62–69]. Напротив, рецидивирующие спонтанные припадки при хронической ЭВД ассоциированы со значительно сниженным нейрогенезом, аномальной реорганизацией нейронных сетей, потерей функционального

торможения в гиппокампе и экстрагиппокампальных областях [70]. Такие изменения также сопровождаются нарушениями обучения, памяти и депрессией [71, 72]. Это не удивительно, потому что нормальный нейрогенез важен как для обучения/памяти, так и для поддержания нормального эмоционального состояния [73]. Подавление нейрогенеза в гиппокампе считают одним из ключевых механизмов развития депрессивных расстройств [74–77], поэтому снижение нейрогенеза при ЭВД потенциально является основой для коморбидности с депрессией. Для пациентов с фармакорезистентной ЭВД и коморбидной депрессией, перенесших хирургическую операцию, характерен другой паттерн потери экспрессирующих кальбиндин нейронов в зубчатой извилине в сочетании с более высоким спрутингом аксонов этих нейронов по сравнению с пациентами с ЭВД [78]. Эти изменения могут свидетельствовать о нарушениях созревания гранулярных клеток, связанных с феноменом эпилептической гипервозбудимости.

**Нейровоспаление.** За последние годы было сформировано и подтверждено многочисленными экспериментальными данными представление о ключевой роли процессов нейровоспаления при эпилепсии, в т.ч. в гиппокампе при ЭВД [79–83]. Данные другого пула исследований убедительно свидетельствуют о том, что нейровоспаление в гиппокампе играет важную роль и в патогенезе депрессивных расстройств [84, 85]. Современное представление о роли цитокинов как нейромодуляторов в мозге при эпилепсии и депрессии складывается из результатов исследований с участием людей и экспериментальных животных [86, 87]. Цитокиновые рецепторы присутствуют в нейронах и популяциях глиальных клеток в определенных областях мозга. В гиппокампе цитокины являются неотъемлемыми участниками физиологических процессов, таких как память и обучение; они также вовлечены в патологические состояния, такие как депрессия и эпилепсия. В норме интерлейкин-1 $\beta$  необходим для поддержания долговременной потенциации в гиппокампе, а интерлейкин-6 играет регуляторную роль в формировании долговременной памяти, оказывая негативный эффект при избыточной концентрации. Секретируемый астроцитами фактор некроза опухоли увеличивает поверхностную транслокацию глутаматных AMPA-рецепторов в глутаматергических синапсах, а хемокин CXCL12 может подавлять тоническую активность нейронов Кахалы–Ретциуса в гиппокампе. При ЭВД отмечено значительное повышение концентрации интерлейкина-10, интерферона- $\gamma$ , ICAM1, CCL2 и CCL4 в гиппокампе больных [88].

Глиальные клетки играют важнейшую роль в патогенезе эпилепсии, модулируя как воспалительные процессы (в первую очередь микроглия, но также и астроциты), так и возбудимость нейронов (астроциты). Механизмы вовлеченности глиальных клеток в эти процессы подробно рассмотрены в обзоре [89]. Потеря нейронов гиппокампа, индуцированная эксайтотоксичностью и нейровоспалением, а также реактивный астроглиоз являются патологическими признаками ЭВД. Функциональные изменения астроцитов гиппокампа у больных с ЭВД ассоциированы с психическими расстройствами и экспрессией связанных с астроглиозом генов глиального фибриллярного кислого белка, металлотионеина-I/II и аквапорина-4 [90].

**Глутаматергическая система.** Изменения глутаматергической системы, основной системы возбуждающей нейротрансмиссии височной доли, описаны как при эпилепсии, при которой они являются ключевыми в развитии избыточного возбуждения [91–96], так и при депрессии [97–101]. Повышенная глутаматергическая нейротрансмиссия (в последнее время часто используется термин «гиперглутаматергическая нейротрансмиссия») в гиппокампе, как центральный фактор патогенеза эпилепсии, депрессии и когнитивных нарушений [101], индуцирует нейродегенеративные изменения и гибель нейронов в гиппокампе. Аберрантная сигнализация затрагивает как ионотропные [102, 103], так и метаболитные рецепторы [104] и индуцирует развитие эксайтотоксичности и окислительного стресса, которые также вносят вклад в коморбидность ЭВД и психиатрических заболеваний [93, 105]. Важно отметить, что к настоящему времени известны многочисленные пути, по которым ГК регулируют функционирование глутаматергических синапсов, на мембранах и в цитоплазме которых экспрессированы минералокортикоидные и глюкокортикоидные рецепторы [51]. Исследования роли глутаматных рецепторов в коморбидности эпилепсии и депрессии на животных моделях только начинаются. Например, на модели флуоксетин-резистентной эпилепсии, ассоциированной с депрессивно-подобным поведением, было показано, что важным фактором развития коморбидной патологии является хроническое нарушение сигнальной трансдукции через NMDA-рецептор, в частности сигнального каскада ERK/CREB/ELK1/BDNF/cFOS и фосфорилирования CREB (cyclic AMP response element binding protein) [106]. Интересно отметить, что глутаматные синапсы содержат и каннабиноидные рецепторы, а нарушения эндоканнабиноидной системы вовлечены как в эпи-

лептогенез, так и в фармакорезистентность и психиатрическую коморбидность у пациентов с ЭВД [107, 108]. Эпилепсия и расстройства настроения имеют также общие рецепторные и трансдукционные механизмы систем серотонина, дофамина и  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК) [109].

**Система BDNF.** Роль системы BDNF в гиппокампе подробно изучена как в эпилептогенезе при ЭВД ([110, 111], рис. 3), так и в развитии депрессивных расстройств [112, 113]. В обоих случаях недостаточность BDNF ассоциирована со снижением нейрогенеза и усилением нейровоспалительных процессов в гиппокампе. Система BDNF тесно связана с функционированием нейронов различного типа, потенциально важных для коморбидности эпилепсии и депрессии; в первую очередь она осуществляет мультифакторную реципрокную регуляцию глутаматергической системой [114].

**Общность молекулярных механизмов стрессорного ответа и эпилептогенеза.** Принципиально важно еще раз подчеркнуть, что все упомянутые выше основные молекулярные механизмы, вовлеченные в повреждение гиппокампа при ответе на хронический стресс, ассоциированный с эпилептогенезом/эпилепсией и развитием коморбидного депрессивного расстройства, являются взаимозависимыми. При этом центральным интегрирующим не только на уровне мозга, но и целого организма, и модулирующим звеном является ГГКС, нарушения которой проявляются в избытке ГК и в дисфункции ГР (рис. 4).

В соответствии со схемой, представленной на рисунке 4, принципиально важно, что молекулярные механизмы стрессорного ответа и эпилептогенеза являются общими, и это обеспечивает коморбидность эпилепсии и других индуцируемых стрессом заболеваний, в частности депрессивных/тревожных расстройств. В центре сложной системы взаимосвязанных молекулярных процессов находится дисфункция ГГКС, связанная с нарушением баланса кортикостероидных рецепторов и приводящая к гиперкортизолемии, определяющей второй важнейший узел схемы. Системы возбуждающего нейромедиатора глутамата и нейротрофина BDNF принципиально важны для феноменов клеточной и синаптической пластичности. Они связаны многочисленными реципрокными связями, обеспечивающими взаимную регуляцию этих систем [114]. Именно сложная, но хорошо скоординированная природа этих взаимоотношений обеспечивает оптимальную клеточную и синаптическую пластичность мозга в норме. Обе системы связаны с патогенезом аффектив-



**Рис. 4.** Основные молекулярные механизмы, вовлеченные в повреждение гиппокампа при ответе на хронический стресс, ассоциированный с эпилептогенезом, эпилепсией и развитием коморбидного депрессивного расстройства. Центральным интегрирующим и модулирующим звеном этих взаимосвязанных механизмов является ГГАКС, нарушения которой проявляются в избытке ГК и дисфункции ГР. Подробные объяснения в тексте статьи

ных расстройств, и нарушение тесных и сбалансированных взаимоотношений между ними вызывает неблагоприятные изменения нейропластичности, лежащие в основе судорожной активности, депрессии, тревожности и других психических заболеваний. Нейровоспаление, реализуемое в ответ на дисфункцию ГГАКС в основном активированной микроглией, также тесно связано с упомянутыми выше системами и индуцирует нейродегенерацию и гибель нейронов лимбической системы мозга, а также подавление нейрогенеза. Избыток кортикостероидов, секретированных в условиях ЭВД, особенно у пациентов с исходно аномальным стрессорным ответом в связи с дисфункцией ГГАКС, взаимодействует с ГР гиппокампа, индуцируя сигнальные пути, стимулирующие нейровоспаление и последующие события, включая нарушения нейрогенеза и нейродегенерацию [21, 41, 60].

Функциональные и структурные повреждения гиппокампа, селективно уязвимо при действии внешних факторов и отвечающего на них повышением секреции цитокинов [115], составляют индивидуальную основу для развития как эпилепсии, так и депрессивно-тревожных расстройств.

#### ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ КОМОРБИДНОСТИ ЭПИЛЕПСИИ И ДЕПРЕССИИ

Описанные выше механизмы патогенеза эпилепсии на уровне молекул и клеток имеют место и при депрессивных расстройствах. Составляя основу коморбидности этих заболеваний, они несомненно должны формировать базу и для общих механизмов на сетевом и систем-

ном уровнях. Эпилепсия характеризуется как расстройство, связанное с повторяющимися припадками, которые определяются как «преходящее возникновение признаков и/или симптомов вследствие аномальной чрезмерной или синхронной активности нейронов в головном мозге» [116]. Такая гиперактивность является результатом патологической активности в больших группах или сетях нейронов. Организация и потенциальные механизмы регуляции aberrантных нейронных сетей при ЭВД подробно рассматриваются в работе Alexander et al. [116] как на уровне «микросхем», т.е. отношений между отдельными нейронами или небольшими группами нейронов, так и на уровне макросистем, охватывающих большие области мозга. ЭВД — хорошая биологическая модель для установления общей структурной основы между депрессией и эпилепсией. Эти заболевания имеют сходные свойства нейронных сетей, включающих височные доли с гиппокампом, миндалинной и энторинальной корой и неокортексом; лобные доли с поясной извилиной; подкорковые структуры, такие как базальные ганглии и таламус, а также соединительные пути [117]. Иными словами, существуют клинические и структурные доказательства того, что депрессия и ЭВД представляют собой эпифеномен, в основе которого лежат сходные свойства нейронных сетей.

Обычно при рассмотрении коморбидности заболеваний возникает неоднозначно решаемый вопрос о том, какое из них первично. Считают, что депрессия и тревожность при эпилепсии отражают дисфункцию широко распределенных лимбических сетей, которая может быть причиной или следствием эпилептогенеза. При рефрактерной эпилепсии как судороги, так и некоторые противосудорожные препараты могут нарушать функционирование центральных гомеостатических механизмов, лежащих в основе эмоций, и повышать риск последующих приступов [118]. При ЭВД нейронные сети, связанные со страхом, ассоциированы с симптомами тревоги и икталной паники [6]; многие исследователи рассматривают изменения в нейронных сетях при ЭВД как основу и для психических расстройств [5]. Тем не менее обзор нейровизуализационных данных взрослых пациентов с эпилепсией и депрессией показал их противоречивость. В частности, некоторые авторы предполагают, что депрессия (по крайней мере при ЭВД) связана с другим паттерном изменений мозга по сравнению с большой депрессией, и это подтверждает представление ряда авторов о феноменологических особенностях депрессии при эпилепсии [119].

Интересно, что нейротизм, основная черта личности, характеризующаяся склонностью к переживанию негативных аффектов, выше у людей с ЭВД по сравнению с популяционным уровнем. Нейротизм является известным предиктором депрессии и тревоги, которые также чаще встречаются у людей с ЭВД. По данным работы Rivera Bonet et al. [120], при повышенном нейротизме у пациентов с депрессией и тревожными симптомами существуют как уникальные, так и общие паттерны аномальной функциональной коннективности сетей покоя между областями мезиальной височной и лобной долей. Например, повышенный нейротизм достоверно ассоциирован с гипосинхронией между правым гиппокампом и областью Бродмана — и эта уникальная связь не зависит от симптомов депрессии и тревоги.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ: ГИППОКАМП КАК КОНТРАПУНКТ СТРЕССА, ЭПИЛЕПСИИ И ДЕПРЕССИИ**

Эпилепсия — это неврологическое состояние, связанное с судорогами, нейродегенерацией, перестройкой нейронных сетей и другими структурными и функциональными нарушениями. Последние могут приводить как к изменению поведения и эмоционального состояния (тревога, депрессия), так и к когнитивным дисфункциям (неспособность к обучению, ухудшение памяти) и ускоренному старению. Все больше исследователей отмечает общие механизмы развития нейродегенеративных заболеваний, депрессивных расстройств и эпилепсии [21, 121]. При этом когнитивные нарушения и эмоционально-личностные расстройства рассматривают как симптомы, а гиппокамп — как принципиальную область поражения.

К настоящему времени накоплен значительный пул клинических и экспериментальных данных, которые доказательно связывают ЭВД с депрессией. При изучении механизмов патогенеза этих коморбидных заболеваний используется множество подходов от ультраструктурного уровня, например, анализа экспрессии клеточных рецепторов, до поведенческого уровня, например, исследования коморбидной депрессии у животных при моделировании эпилепсии. Изучение нейробиологических аспектов расстройств настроения при ЭВД, первичных расстройств настроения и патогенетических механизмов эпилепсии, полученных в исследованиях с участием людей и на животных моделях, позволяет лучше понять сложную взаимосвязь между этими состояниями, а комплексные ис-

следования позволяют выявить формирующуюся картину общих патофизиологических механизмов.

Обосновывая концепцию о континууме нейропластичности и нейропатологии [47], мы подчеркивали общность и плейотропность (вовлеченность как в реализацию нормальной адаптивной пластичности, так и в патогенез заболевания мозга) механизмов на молекулярном, синаптическом, клеточном и сетевом уровнях. Эти механизмы ассоциированы с высокой адаптивной пластичностью гиппокампа, ответственного за интегративную функцию мозга, в частности обучение, память и эмоции. Однако ценой высокой пластичности является селективная чувствительность гиппокампа к развитию патологических процессов. Сигнализация путем секреции малых молекул характерна как для нервной, так и для эндокринной и иммунной систем. Масштабы и значение взаимодействия между этими системами организма стали объектами научного исследования только в последнее время. Нейромедиаторы, гормоны и цитокины воздействуют на клетки-мишени через мембранные или внутриклеточные рецепторы, включающие каскадные молекулярные механизмы. Одной из ключевых центральных структур, регулирующих взаимодействие между этими системами, несомненно является гиппокамп.

Появляется все больше доказательств того, что при эпилепсии и депрессии изменения во взаимодействии серотонин- и норадренергических нейронов с глутаматергическими системами связано с аномальными нейронными сетями и повышенной возбудимостью. Гипервозбудимость нейронов может вызывать судорожную активность, а также тревожные эмоции. Кроме того, изменение синаптических концентраций нейромедиаторов и высокий уровень ГК влияют на внутриклеточные сигнальные пути, вызывая нарушения системы нейротрофинов и других нейротрофических факторов [122]. Коморбидные механизмы могут быть ассоциированы с атрофией гиппокампа, наблюдаемой при магнитно-резонансной томографии, и нарушением памяти. Исследования с использованием позитронно-эмиссионной томографии дополнительно указывают на гипометаболизм глюкозы в височных и лобных долях. При ЭВД и депрессии

астроциты вовлечены в различные процессы, играя роль, которая выходит далеко за рамки их участия в склерозе гиппокампа. Все эти механизмы тесно переплетены и, вероятно, двунаправлены, так что структурные и функциональные изменения от одного заболевания увеличивают риск развития другого. Контрапунктом депрессии и эпилепсии является лимбическая система, в первую очередь гиппокамп.

Понимание общих нейробиологических механизмов патогенеза, ответственных за коморбидность эпилепсии и депрессии, имеет высокую трансляционную значимость и потенциальное применение в клинической практике. Существование общих механизмов может влиять на течение эпилепсии и реакцию на фармакологическое и хирургическое лечение судорожных расстройств у пациентов с депрессией в анамнезе. Индивидуальная стресс-реактивность пациента является фактором, принципиально значимым для развития эпилепсии и коморбидных психических расстройств. К сожалению, достаточно простые и эффективные подходы к оценке индивидуальной стресс-реактивности, основанные на уровнях маркеров стресса, не применяются у пациентов с эпилепсией. Маркеры могут быть проанализированы как в крови, так и неинвазивно (в волосах, слюне и т.д.) [39]; информативность этих данных повышается при использовании легкого стрессорного тестового воздействия [123]. Представление о роли индивидуальной стресс-реактивности в развитии эпилепсии и коморбидных заболеваний может быть экспериментально подтверждено и использовано в практической медицине для разработки новых персонализированных стратегий коррекции функционального состояния организма и контроля эффективности лечения.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-115-50019 Экспансия).

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gulyaeva, N. V. (2017) Molecular mechanisms of neuroplasticity: an expanding universe, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 237-242, doi: 10.1134/S0006297917030014.
2. Kanner, A. M. (2017) Psychiatric comorbidities in new onset epilepsy: should they be always investigated? *Seizure*, **49**, 79-82, doi: 10.1016/j.seizure.2017.04.007.

3. Kanner, A. M. (2016) Psychiatric comorbidities in epilepsy: should they be considered in the classification of epileptic disorders? *Epilepsy Behav.*, **64** (Pt B), 306-308, doi: 10.1016/j.yebeh.2016.06.040.
4. Ribot, R., and Kanner, A. M. (2019) Neurobiologic properties of mood disorders may have an impact on epilepsy: should this motivate neurologists to screen for this psychiatric comorbidity in these patients? *Epilepsy Behav.*, **98** (Pt B), 298-301, doi: 10.1016/j.yebeh.2019.01.026.
5. Sair, A., Şair, Y. B., Saracoğlu, İ., Sevincok, L., and Akyol, A. (2021) The relation of major depression, OCD, personality disorders and affective temperaments with temporal lobe epilepsy, *Epilepsy Res.*, **171**, 106565, doi: 10.1016/j.eplepsyres.2021.106565.
6. Melo, H. M., Guarnieri, R., Vascounto, H. D., Formolo, D. A., de Carvalho, C. R., et al. (2020) Ictal fear is associated with anxiety symptoms and interictal dysphoric disorder in drug-resistant mesial temporal lobe epilepsy, *Epilepsy Behav.*, **115**, 107548, doi: 10.1016/j.yebeh.2020.107548.
7. Kim, S. J., Lee, S. A., Ryu, H. U., Han, S. H., Lee, G. H., et al. (2020) Factors associated with obsessive-compulsive symptoms in people with epilepsy, *Epilepsy Behav.*, **102**, 106723, doi: 10.1016/j.yebeh.2019.106723.
8. Novais, F., Franco, A., Loureiro, S., Andrea, M., Figueira, M. L., Pimentel, J., and Pestana, L. C. (2019) Personality patterns of people with medically refractory epilepsy – does the epileptogenic zone matter? *Epilepsy Behav.*, **97**, 130-134, doi: 10.1016/j.yebeh.2019.05.049.
9. Ho, P. H., Leung, W. C. Y., Leung, I. Y. H., and Chang, R. S. K. (2020) Factors associated with depression in people with epilepsy: a retrospective case-control analysis, *Hong Kong Med. J.*, **26**, 311-317, doi: 10.12809/hkmj198310.
10. Sankar, R., and Mazarati, A. (2012) Neurobiology of depression as a comorbidity of epilepsy, in *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]* (Noebels, J. L., Avoli, M., Rogawski, M. A., Olsen, R. W., and Delgado-Escueta, A. V., eds) 4th Edn., Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
11. Duric, V., Clayton, S., Leong, M. L., and Yuan, L. L. (2016) Comorbidity factors and brain mechanisms linking chronic stress and systemic illness, *Neural Plast.*, **2016**, 5460732, doi: 10.1155/2016/5460732.
12. Du Preez, A., Eum, J., Eiben, I., Eiben, P., Zunszain, P. A., et al. (2020) Do different types of stress differentially alter behavioural and neurobiological outcomes associated with depression in rodent models? A systematic review, *Front. Neuroendocrinol.*, **61**, 100896, doi: 10.1016/j.yfrne.2020.100896.
13. Khan, A. R., Geiger, L., Wiborg, O., and Czéh, B. (2020) Stress-induced morphological, cellular and molecular changes in the brain-lessons learned from the chronic mild stress model of depression, *Cells*, **9**, 1026, doi: 10.3390/cells9041026.
14. Li, M., Fu, X., Xie, W., Guo, W., Li, B., et al. (2020) Effect of early life stress on the epigenetic profiles in depression, *Front. Cell. Dev. Biol.*, **8**, 867, doi: 10.3389/fcell.2020.00867.
15. Negrón-Oyarzo, I., Aboitiz, F., and Fuentealba, P. (2016) Impaired functional connectivity in the prefrontal cortex: a mechanism for chronic stress-induced neuropsychiatric disorder, *Neural Plast.*, **2016**, 753906, doi: 10.1155/2016/753906.
16. Ross, R. A., Foster, S. L., and Ionescu, D. F. (2017) The role of chronic stress in anxious depression, chronic stress (thousand oaks), *Chronic Stress*, **1**, 2470547016689472, doi: 10.1177/2470547016689472.
17. Larrieu, T., and Sandi, C. (2018) Stress-induced depression: is social rank a predictive risk factor? *Bioessays*, **40**, e1800012, doi: 10.1002/bies.201800012.
18. Slavich, G. M., and Sacher, J. (2019) Stress, sex hormones, inflammation, and major depressive disorder: extending social signal transduction theory of depression to account for sex differences in mood disorders, *Psychopharmacology (Berl)*, **236**, 3063-3079, doi: 10.1007/s00213-019-05326-9.
19. Sotiropoulos, I., Silva, J. M., Gomes, P., Sousa, N., and Almeida, O. F. X. (2019) Stress and the etiopathogenesis of Alzheimer's disease and depression, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1184**, 241-257, doi: 10.1007/978-981-32-9358-8\_20.
20. LeMoult, J., Humphreys, K. L., Tracy, A., Hoffmeister, J. A., Ip, E., and Gotlib, I. H. (2020) Meta-analysis: exposure to early life stress and risk for depression in childhood and adolescence, *J. Am. Acad. Child. Adolesc. Psychiatry*, **59**, 842-855, doi: 10.1016/j.jaac.2019.10.011.
21. Gulyaeva, N. V. (2019) Biochemical mechanisms and translational relevance of hippocampal vulnerability to distant focal brain injury: the price of stress response, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1306-1328, doi: 10.1134/S0006297919110087.
22. Joëls, M. (2018) Corticosteroids and the brain, *J. Endocrinol.*, **238**, R121-R130, doi: 10.1530/JOE-18-0226.
23. Gulyaeva, N. V. (2015) Ventral hippocampus, stress and psychopathology: translational implications, *Neurochem. J.*, **9**, 85-94, doi: 10.1134/S1819712415020075.
24. Licht, T., Sasson, E., Bell, B., Grunewald, M., Kumar, S., et al. (2020) Hippocampal neural stem cells facilitate access from circulation via apical cytoplasmic processes, *Elife*, **9**, e52134, doi: 10.7554/eLife.52134.
25. Tuem, K. B., and Atey, T. M. (2017) Neuroactive steroids: receptor interactions and responses, *Front. Neurol.*, **8**, 442, doi: 10.3389/fneur.2017.00442.
26. Saboory, E., Mohammadi, S., Dindarian, S., and Mohammadi, H. (2019) Prenatal stress and elevated seizure susceptibility: molecular inheritable changes, *Epilepsy Behav.*, **96**, 122-131, doi: 10.1016/j.yebeh.2019.04.046.
27. Galtrey, C. M., Mula, M., and Cock, H. R. (2016) Stress and epilepsy: fact or fiction, and what can we do about it? *Pract. Neurol.*, **16**, 270-278, doi: 10.1136/practneurol-2015-001337.
28. Novakova, B., Harris, P. R., Ponnusamy, A., and Reuber, M. (2013) The role of stress as a trigger for epileptic seizures: a narrative review of evidence from human and animal studies, *Epilepsia*, **54**, 1866-76, doi: 10.1111/epi.12377.
29. Kanner, A. M., Schachter, S. C., Barry, J. J., Hesdorffer, D. C., Mula, M., et al. (2012) Depression and epilepsy: epidemiologic and neurobiologic perspectives that may explain their high comorbid occurrence, *Epilepsy Behav.*, **24**, 156-68, doi: 10.1016/j.yebeh.2012.01.007.
30. McKee, H. R., and Privitera, M. D. (2017) Stress as a seizure precipitant: Identification, associated factors, and treatment options, *Seizure*, **44**, 21-26, doi: 10.1016/j.seizure.2016.12.009.
31. Gunn, B. G., and Baram, T. Z. (2017) Stress and seizures: space, time and hippocampal circuits, *Trends Neurosci.*, **40**, 667-679, doi: 10.1016/j.tins.2017.08.004.
32. Cano-López, I., and González-Bono, E. (2019) Cortisol levels and seizures in adults with epilepsy: a systematic review, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **103**, 216-229, doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.05.023.



33. Kotwas, I., McGonigal, A., Bastien-Toniazzo, M., Bartolome, I. F., and Micoulaud-Franchi, J. A. (2017) Stress regulation in drug-resistant epilepsy, *Epilepsy Behav.*, **71** (Pt A), 39-50, doi: 10.1016/j.yebeh.2017.01.025.
34. Yang, Y., Yang, M., Shi, Q., Wang, T., and Jiang, M. (2020) Risk factors for depression in patients with epilepsy: a meta-analysis, *Epilepsy Behav.*, **106**, 107030, doi: 10.1016/j.yebeh.2020.107030.
35. Błaszczuk, B., and Czuczwar, S. J. (2016) Epilepsy coexisting with depression, *Pharmacol. Rep.*, **68**, 1084-1092, doi: 10.1016/j.pharep.2016.06.011.
36. Hingray, C., McGonigal, A., Kotwas, I., and Micoulaud-Franchi, J. A. (2019) The relationship between epilepsy and anxiety disorders, *Curr. Psychiatry Rep.*, **21**, 40, doi: 10.1007/s11920-019-1029-9.
37. Wulsin, A. C., Solomon, M. B., Privitera, M. D., Danzer, S. C., and Herman, J. P. (2016) Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis dysfunction in epilepsy, *Physiol. Behav.*, **166**, 22-31, doi: 10.1016/j.physbeh.2016.05.015.
38. Jones, N. C., and O'Brien, T. J. (2013) Stress, epilepsy, and psychiatric comorbidity: how can animal models inform the clinic? *Epilepsy Behav.*, **26**, 363-369, doi: 10.1016/j.yebeh.2012.09.002.
39. Pochigaeva, K., Druzhkova, T., Yakovlev, A., Onufriev, M., Grishkina, M., et al. (2017) Hair cortisol as a marker of hypothalamic-pituitary-adrenal Axis activity in female patients with major depressive disorder, *Metab. Brain Dis.*, **32**, 577-583, doi: 10.1007/s11011-017-9952-0.
40. Kanner, A. M. (2017) Can neurochemical changes of mood disorders explain the increase risk of epilepsy or its worse seizure control? *Neurochem. Res.*, **42**, 2071-2076, doi: 10.1007/s11064-017-2331-8.
41. Gulyaeva, N. V. (2019) Functional neurochemistry of the ventral and dorsal hippocampus: Stress, depression, dementia and remote hippocampal damage, *Neurochem. Res.*, **44**, 1306-1322, doi: 10.1007/s11064-018-2662-0.
42. Maguire, J., Salpekar, J. A. (2013) Stress, seizures, and hypothalamic-pituitary-adrenal axis targets for the treatment of epilepsy, *Epilepsy Behav.*, **26**, 352-362, doi: 10.1016/j.yebeh.2012.09.040.
43. Basu, T., Maguire, J., Salpekar, J. A. (2021) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis targets for the treatment of epilepsy, *Neurosci. Lett.*, **746**, 135618, doi: 10.1016/j.neulet.2020.135618.
44. Gulyaeva, N. V. (2015) Neuronal plasticity and epilepsy: modern concepts and mechanisms of epilepsy and depression comorbidity, *Zh. Nevrol. Psikiatr. Im. S. S. Korsakova*, **115**, 148-153, doi: 10.17116/jnevro2015115112148-153.
45. Gulyaeva, N. V. (2016) Cerebral plasticity and connectopathies: mechanisms of comorbidity of neurological diseases and depression, *Zh. Nevrol. Psikiatr. Im. S. S. Korsakova*, **116**, 157-162, doi: 10.17116/jnevro201611611157-162.
46. Gulyaeva, N. V. (2017) Staging of neuroplasticity alterations during epileptogenesis (temporal lobe epilepsy as an example), *Zh. Nevrol. Psikiatr. Im. S. S. Korsakova*, **117**, 10-16, doi: 10.17116/jnevro20171179210-16.
47. Gulyaeva, N. V. (2020) Physiological continuum of plasticity and pathology of the nervous system [in Russian], *Integr. Physiol.*, **1**, 294-302, doi: 10.33910/2687-1270-2020-1-4-294-302.
48. Stepanichev, M., Dygalo, N. N., Grigoryan, G., Shishkina, G. T., and Gulyaeva, N. (2014) Rodent models of depression: neurotrophic and neuroinflammatory biomarkers, *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 932757, doi: 10.1155/2014/932757.
49. Kanner, A. M. (2008) Mood disorder and epilepsy: a neurobiologic perspective of their relationship, *Dialogues Clin. Neurosci.*, **10**, 39-45, doi: 10.31887/DCNS.2008.10.1/amkanner.
50. Pauli, E., and Stefan, H. (2009) Emotional and affective disorders, anxiety and personality disorders in epilepsies, *Nervenarzt*, **80**, 1440-1451, doi: 10.1007/s00115-009-2740-2.
51. Gulyaeva, N. V. (2021) Glucocorticoid regulation of the glutamatergic synapse: Mechanisms of stress-dependent neuroplasticity, *Ross. Fiziologicheskii Zhurnal im. I. M. Sechenova (Sechenov Physiology Journal)*, **107**, 518-532, doi: 10.31857/S0869813921040099.
52. Conrad, C. D. (2008) Chronic stress-induced hippocampal vulnerability: the glucocorticoid vulnerability hypothesis, *Rev. Neurosci.*, **19**, 395-411, doi: 10.1515/revneuro.2008.19.6.395.
53. Van Campen, J. S., Valentijn, F.A., Jansen, F. E., Joels, M., and Braun, K. P. (2015) Seizure occurrence and the circadian rhythm of cortisol: a systematic review, *Epilepsy Behav.*, **47**, 132-137, doi: 10.1016/j.yebeh.2015.04.071.
54. Van Campen, J. S., Hompe, E.L., Jansen, F. E., Velis, D.N., Otte, W.M., et al. (2016) Cortisol fluctuations relate to interictal epileptiform discharges in stress sensitive epilepsy, *Brain*, **139** (Pt 6), 1673-1679, doi: 10.1093/brain/aww071.
55. D'Alessio, L., Mesarsova, L., Anink, J. J., Kochen, S., Solis, P., et al. (2020) Reduced expression of the glucocorticoid receptor in the hippocampus of patients with drug-resistant temporal lobe epilepsy and comorbid depression, *Epilepsia*, **61**, 1595-1605, doi: 10.1111/epi.16598.
56. Wulsin, A. C., Franco-Villanueva, A., Romancheck, C., Morano, R. L., Smith, B. L., et al. (2018) Functional disruption of stress modulatory circuits in a model of temporal lobe epilepsy, *PLoS One*, **13**, e0197955, doi: 10.1371/journal.pone.0197955.
57. Wulsin, A. C., Herman, J. P., and Danzer, S. C. (2016) RU486 mitigates hippocampal pathology following status epilepticus, *Front. Neurol.*, **7**, 214, doi: 10.3389/fneur.2016.00214.
58. Aniol, V. A., Ivanova-Dyatlova, A. Y., Keren, O., Guekht, A. B., Sarne, Y., and Gulyaeva, N. V. (2013) A single pentylene-tetrazole-induced clonic-tonic seizure episode is accompanied by a slowly developing cognitive decline in rats, *Epilepsy Behav.*, **26**, 196-202, doi: 10.1016/j.yebeh.2012.12.006.
59. Gulyaeva, N. V. (2010) Aberrant neurogenesis in adult epileptic brain: compensatory or pathologic, *Neurochem. J.*, **4**, 84-89, doi: 10.1134/S1819712410020029.
60. Podgorny, O. V., and Gulyaeva, N. V. (2021) Glucocorticoid-mediated mechanisms of hippocampal damage: Contribution of subgranular neurogenesis, *J. Neurochem.*, **157**, 370-392, doi: 10.1111/jnc.15265.
61. Kuruba, R., Hattiangady, B., and Shetty, A. K. (2009) Hippocampal neurogenesis and neural stem cells in temporal lobe epilepsy, *Epilepsy Behav.*, **14** (Suppl 1), 65-73, doi: 10.1016/j.yebeh.2008.08.020.
62. Parent, J. M., and Lowenstein, D. H. (2002) Seizure-induced neurogenesis: are more new neurons good for an adult brain? *Prog. Brain. Res.*, **135**, 121-131, doi: 10.1016/S0079-6123(02)35012-X.
63. Parent, J. M. (2002) The role of seizure-induced neurogenesis in epileptogenesis and brain repair, *Epilepsy Res.*, **50**, 179-189, doi: 10.1016/s0920-1211(02)00078-5.

64. Parent, J. M. (2007) Adult neurogenesis in the intact and epileptic dentate gyrus, *Prog. Brain Res.*, **163**, 529-540, doi: 10.1016/S0079-6123(07)63028-3.
65. Kokaia, M. (2011) Seizure-induced neurogenesis in the adult brain, *Eur. J. Neurosci.*, **33**, 1133-1138, doi: 10.1111/j.1460-9568.2011.07612.x.
66. Jessberger, S., and Parent, J. M. (2015) Epilepsy and adult neurogenesis, *Cold Spring Harb Perspect. Biol.*, **7**, a020677, doi: 10.1101/cshperspect.a020677.
67. Scharfman, H. E. (2004) Functional implications of seizure-induced neurogenesis, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **548**, 192-212, doi: 10.1007/978-1-4757-6376-8\_14.
68. Scharfman, H. E., and Gray, W. P. (2007) Relevance of seizure-induced neurogenesis in animal models of epilepsy to the etiology of temporal lobe epilepsy, *Epilepsia*, **48** (Suppl 2), 33-41, doi: 10.1111/j.1528-1167.2007.01065.x.
69. Siebzehnruhl, F. A., and Blumcke, I. (2008) Neurogenesis in the human hippocampus and its relevance to temporal lobe epilepsies, *Epilepsia*, **49** (Suppl 5), 55-65, doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01638.x.
70. Hattiangady, B., and Shetty, A. K. (2008) Implications of decreased hippocampal neurogenesis in chronic temporal lobe epilepsy, *Epilepsia*, **49** (Suppl 5), 26-41, doi: 10.1111/j.1528-1167.2008.01635.x.
71. Danzer, S. C. (2012) Depression, stress, epilepsy and adult neurogenesis, *Exp. Neurol.*, **233**, 22-32, doi: 10.1016/j.exp-neurol.2011.05.023.
72. Braun, S. M., and Jessberger, S. (2014) Adult neurogenesis and its role in neuropsychiatric disease, brain repair and normal brain function, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **40**, 3-12, doi: 10.1111/nan.12107.
73. Abrous, D. N., Koehl, M., and Le Moal, M. (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology, *Physiol. Rev.*, **85**, 523-569, doi: 10.1152/physrev.00055.2003.
74. Hayashi, Y., Jinnou, H., Sawamoto, K., and Hitoshi, S. (2018) Adult neurogenesis and its role in brain injury and psychiatric diseases, *J. Neurochem.*, **147**, 584-594, doi: 10.1111/jnc.14557.
75. Lino de Oliveira, C., Bolzan, J. A., Surget, A., and Belzung, C. (2020) Do antidepressants promote neurogenesis in adult hippocampus? A systematic review and meta-analysis on naive rodents, *Pharmacol. Ther.*, **210**, 107515, doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107515.
76. Patel, D., Kas, M. J., Chattarji, S., and Buwalda, B. (2019) Rodent models of social stress and neuronal plasticity: relevance to depressive-like disorders, *Behav. Brain Res.*, **369**, 111900, doi: 10.1016/j.bbr.2019.111900.
77. Planchez, B., Surget, A., and Belzung, C. (2020) Adult hippocampal neurogenesis and antidepressant effects, *Curr. Opin. Pharmacol.*, **50**, 88-95, doi: 10.1016/j.coph.2019.11.009.
78. D'Alessio, L., Konopka, H., Solís, P., Scévola, L., Lima, M. F., et al. (2019) Depression and temporal lobe epilepsy: expression pattern of calbindin immunoreactivity in hippocampal dentate gyrus of patients who underwent epilepsy surgery with and without comorbid depression, *Behav. Neurol.*, **2019**, 7396793, doi: 10.1155/2019/7396793.
79. Vezzani, A., Balosso, S., and Ravizza, T. (2019) Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy, *Nat. Rev. Neurol.*, **15**, 459-472, doi: 10.1038/s41582-019-0217-x.
80. Vezzani, B., Carinci, M., Patergnani, S., Pasquin, M. P., Guarino, A., et al. (2020) The dichotomous role of inflammation in the CNS: a mitochondrial point of view, *Biomolecules*, **10**, 1437, doi: 10.3390/biom10101437.
81. Sharma, A. A., and Szaflarski, J. P. (2020) *In vivo* imaging of neuroinflammatory targets in treatment-resistant epilepsy, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, **20**, 5, doi: 10.1007/s11910-020-1025-9.
82. Mukherjee, S., Arisi, G. M., Mims, K., Hollingsworth, G., O'Neil, K., and Shapiro, L. A. (2020) Neuroinflammatory mechanisms of post-traumatic epilepsy, *J. Neuroinflammation*, **17**, 193, doi: 10.1186/s12974-020-01854-w.
83. Sanz, P., and Garcia-Gimeno, M. A. (2020) Reactive glia inflammatory signaling pathways and epilepsy, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4096, doi: 10.3390/ijms21114096.
84. Meyer, J. H., Cervenka, S., Kim, M. J., Kreisl, W. C., Henter, I. D., and Innis, R. B. (2020) Neuroinflammation in psychiatric disorders: PET imaging and promising new targets, *Lancet Psychiatry*, **7**, 1064-1074, doi: 10.1016/S2215-0366(20)30255-8.
85. Troubat, R., Barone, P., Leman, S., Desmidt, T., Cressant, A., et al. (2021) Neuroinflammation and depression: a review, *Eur. J. Neurosci.*, **53**, 151-171, doi: 10.1111/ejn.14720.
86. Ting, E. Y., Yang, A. C., and Tsai, S. J. (2020) Role of interleukin-6 in depressive disorder, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2194, doi: 10.3390/ijms21062194.
87. Tsai, S. J. (2021) Role of interleukin 8 in depression and other psychiatric disorders, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **106**, 110173, doi: 10.1016/j.pnpbp.2020.110173.
88. Arisi, G. M. (2014) Nervous and immune systems signals and connections: cytokines in hippocampus physiology and pathology, *Epilepsy Behav.*, **38**, 43-47, doi: 10.1016/j.yebeh.2014.01.017.
89. Devinsky, O., Vezzani, A., Najjar, S., De Lanerolle, N. C., and Rogawski, M. A. (2013) Glia and epilepsy: excitability and inflammation, *Trends Neurosci.*, **36**, 174-184, doi: 10.1016/j.tins.2012.11.008.
90. Lu, J., Huang, H., Zeng, Q., Zhang, X., Xu, M., et al. (2019) Hippocampal neuron loss and astrogliosis in medial temporal lobe epileptic patients with mental disorders, *J. Integr. Neurosci.*, **18**, 127-132, doi: 10.31083/j.jin.2019.02.16.
91. Albrecht, J., and Zielińska, M. (2017) Mechanisms of excessive extracellular glutamate accumulation in and temporal lobe epilepsy, *Neurochem. Res.*, **42**, 1724-1734, doi: 10.1007/s11064-016-2105-8.
92. Barker-Haliski, M., and White, H. S. (2015) Glutamate-ergic mechanisms associated with seizures and epilepsy, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **5**, a022863, doi: 10.1101/cshperspect.a022863.
93. Eid, T., Gruenbaum, S. E., Dhaher, R., Lee, T. W., Zhou, Y., and Danbolt, N. C. (2016) The glutamate-glutamine cycle in epilepsy, *Adv. Neurobiol.*, **13**, 351-400, doi: 10.1007/978-3-319-45096-4\_14.
94. Nicolo, J. P., O'Brien, T. J., and Kwan, P. (2019) Role of cerebral glutamate in post-stroke epileptogenesis, *Neuroimage Clin.*, **24**, 102069, doi: 10.1016/j.nicl.2019.102069.
95. O'Neil, D. A., Nicholas, M. A., Lajud, N., Kline, A. E., and Bondi, C. O. (2018) Preclinical models of traumatic brain injury: emerging role of glutamate in the pathophysiology of depression, *Front. Pharmacol.*, **9**, 579, doi: 10.3389/fphar.2018.00579.
96. Cui, W., Ning, Y., Hong, W., Wang, J., Liu, Z., and Li, M. D. (2019) Crosstalk between inflammation and glutamate system in depression: signaling pathway and molecular biomarkers for ketamine's antidepressant effect, *Mol. Neurobiol.*, **56**, 3484-3500, doi: 10.1007/s12035-018-1306-3.

97. Fullana, N., Gasull-Camós, J., Tarrés-Gatius, M., Castañé, A., Bortolozzi, A., and Artigas, F. (2020) Astrocyte control of glutamatergic activity: downstream effects on serotonergic function and emotional behavior, *Neuropharmacology*, **166**, 107914, doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.107914.
98. Henter, I. D., de Sousa, R. T., and Zarate, C. A., Jr. (2018) Glutamatergic modulators in depression, *Harv. Rev. Psychiatry*, **26**, 307-319, doi: 10.1097/HRP.000000000000183.
99. Li, C. T., Yang, K. C., and Lin, W. C. (2019) Glutamatergic dysfunction and glutamatergic compounds for major psychiatric disorders: evidence from clinical neuroimaging studies, *Front. Psychiatry*, **9**, 767, doi: 10.3389/fpsy.2018.00767.
100. Reus, G. Z., de Moura, A. B., Silva, R. H., Resende, W. R., and Quevedo, J. (2018) Resilience dysregulation in major depressive disorder: focus on glutamatergic imbalance and microglial activation, *Curr. Neuropharmacol.*, **16**, 297-307, doi: 10.2174/1570159X15666170630164715.
101. Gulyaeva, N. V. (2021) Hippocampal hyperglutamatergic signaling matters: early targeting glutamate neurotransmission as a preventive strategy in Alzheimer's disease: an editorial highlight for "riluzole attenuates glutamatergic tone and cognitive decline in A $\beta$ PP/PS1 mice" on <https://doi.org/10.1111/jnc.15224>, *J. Neurochem.*, **156**, 399-402, doi: 10.1111/jnc.15238.
102. Hanada, T. (2020) Ionotropic glutamate receptors in epilepsy: a review focusing on AMPA and NMDA receptors, *Biomolecules*, **10**, 464, doi: 10.3390/biom10030464.
103. Mihály, A. (2019) The reactive plasticity of hippocampal ionotropic glutamate receptors in animal epilepsies, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 1030, doi: 10.3390/ijms20051030.
104. Qian, F., and Tang, F. R. (2016) Metabotropic glutamate receptors and interacting proteins in epileptogenesis, *Curr. Neuropharmacol.*, **14**, 551-562, doi: 10.2174/1570159x14666160331142228.
105. Miladinovic, T., Nashed, M. G., and Singh, G. (2015) Overview of glutamatergic dysregulation in central pathologies, *Biomolecules*, **5**, 3112-3141, doi: 10.3390/biom5043112.
106. Sadeghi, M. A., Hemmati, S., Mohammadi, S., Yousefi-Manesh, H., Vafaei, A., et al. (2021) Chronically altered NMDAR signaling in epilepsy mediates comorbid depression, *Acta Neuropathol. Commun.*, **9**, 53, doi: 10.1186/s40478-021-01153-2.
107. Scarante, F. F., Vila-Verde, C., Detoni, V. L., Ferreira-Junior, N. C., Guimarães, F. S., and Campos, A. C. (2017) Cannabinoid modulation of the stressed hippocampus, *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, 411, doi: 10.3389/fnmol.2017.00411.
108. Cheung, K. A. K., Peiris, H., Wallace, G., Holland, O. J., and Mitchell, M. D. (2019) The interplay between the endocannabinoid system, epilepsy and cannabinoids, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 6079, doi: 10.3390/ijms20236079.
109. Rocha, L., Alonso-Vanegas, M., Orozco-Suárez, S., Alcántara-González, D., Cruzblanca, H., and Castro, E. (2014) Do certain signal transduction mechanisms explain the comorbidity of epilepsy and mood disorders? *Epilepsy Behav.*, **38**, 25-31, doi: 10.1016/j.yebeh.2014.01.001.
110. Koyama, R., and Ikegaya, Y. (2005) To BDNF or not to BDNF: that is the epileptic hippocampus, *Neuroscientist*, **11**, 282-287, doi: 10.1177/1073858405278266.
111. McNamara, J. O., and Scharfman, H. E. (2012) Temporal lobe epilepsy and the BDNF receptor, TrkB, in *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]* (Noebels, J. L., Avoli, M., Rogawski, M. A., Olsen, R. W., and Delgado-Escueta, A. V., eds.) 4<sup>th</sup> Edn., Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US).
112. Brunoni, A. R., Lopes, M., and Fregni, F. (2008) A systematic review and meta-analysis of clinical studies on major depression and BDNF levels: implications for the role of neuroplasticity in depression, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **11**, 1169-1180, doi: 10.1017/S1461145708009309.
113. Martinowich, K., Manji, H., and Lu, B. (2007) New insights into BDNF function in depression and anxiety, *Nat. Neurosci.*, **10**, 1089-1093, doi: 10.1038/nn1971.
114. Gulyaeva, N. V. (2017) Interplay between brain BDNF and glutamatergic systems: a brief state of the evidence and association with the pathogenesis of depression, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 301-307, doi: 10.1134/S0006297917030087.
115. Bolshakov, A. P., Tret'yakova, L. V., Kvichansky, A. A., and Gulyaeva, N. V. (2021) Glucocorticoids: Dr. Jekyll and Mr. Hyde of hippocampal neuroinflammation, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 156-167, doi: 10.1134/S0006297921020048.
116. Alexander, A., Maroso, M., and Soltesz, I. (2016) Organization and control of epileptic circuits in temporal lobe epilepsy, *Prog. Brain Res.*, **226**, 127-154, doi: 10.1016/bs.pbr.2016.04.007.
117. Valente, K. D., and Busatto, F. G. (2013) Depression and temporal lobe epilepsy represent an epiphenomenon sharing similar neural networks: clinical and brain structural evidences, *Arq. Neuropsiquiatr.*, **71**, 183-190, doi: 10.1590/s0004-282x2013000300011.
118. Krishnan, V. (2020) Depression and anxiety in the epilepsies: from bench to bedside, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.*, **20**, 41, doi: 10.1007/s11910-020-01065-z.
119. Elkommos, S., and Mula, M. (2020) A systematic review of neuroimaging studies of depression in adults with epilepsy, *Epilepsy Behav.*, **115**, 107695, doi: 10.1016/j.yebeh.2020.107695.
120. Rivera Bonet, C. N., Hwang, G., Hermann, B., Struck, A. F., Cook, C. J., et al. (2020) Neuroticism in temporal lobe epilepsy is associated with altered limbic-frontal lobe resting-state functional connectivity, *Epilepsy Behav.*, **110**, 107172, doi: 10.1016/j.yebeh.2020.107172.
121. Szot, P. (2012) Common factors among Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and epilepsy: possible role of the noradrenergic nervous system., *Epilepsia*, **53** (Suppl 1), 61-66, doi: 10.1111/j.1528-1167.2012.03476.x.
122. Kondziella, D., Alvestad, S., Vaaler, A., and Sonnewald, U. (2007) Which clinical and experimental data link temporal lobe epilepsy with depression? *J. Neurochem.*, **103**, 2136-2152, doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.04926.x.
123. Druzhkova, T., Pochigaeva, K., Yakovlev, A., Kazimirova, E., Grishkina, M., et al. (2019) Acute stress response to a cognitive task in patients with major depressive disorder: potential metabolic and proinflammatory biomarkers, *Metab. Brain. Dis.*, **34**, 621-629, doi: 10.1007/s11011-018-0367-3.

# STRESS-ASSOCIATED SHARED MOLECULAR AND CELLULAR HIPPOCAMPAL MECHANISMS OF EPILEPSY AND COMORBID DEPRESSIVE DISORDERS

## Review

N. V. Gulyaeva<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,  
117485 Moscow, Russia; e-mail: nata\_gul@ihna.ru*

<sup>2</sup> *Research and Clinical Center for Neuropsychiatry of Moscow Healthcare Department, 115419 Moscow, Russia*

The review discusses molecular and cellular mechanisms common to the temporal lobe epileptogenesis/epilepsy and depressive disorders. Comorbid temporal lobe epilepsy and depression are associated with dysfunction of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. Excessive glucocorticoids disrupt the function and impair the structure of the hippocampus, a brain region key to learning, memory, and emotions. Selective vulnerability of the hippocampus to stress, mediated by the reception of glucocorticoid hormones secreted during stress, is the price of the high functional plasticity and pleiotropy of this limbic structure. Common molecular and cellular mechanisms include the dysfunction of glucocorticoid receptors, neurotransmitters, and neurotrophic factors, development of neuroinflammation, leading to neurodegeneration and loss of hippocampal neurons, as well as disturbances in neurogenesis in the subgranular neurogenic niche and formation of aberrant neural networks. These glucocorticoid-dependent processes underlie altered stress response and the development of chronic stress-induced comorbid pathologies, in particular, temporal lobe epilepsy and depressive disorders.

*Keywords:* epilepsy, temporal lobe epilepsy, depression, hippocampus, glucocorticoids, stress, neuroinflammation, hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis, neurogenesis, neural networks

УДК 577.25

## ИЗМЕНЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ И НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕ В ГИППОКАМПЕ ПОСЛЕ ФОКАЛЬНОЙ ИШЕМИИ МОЗГА: УЧАСТИЕ В ИНДУКЦИИ ДЛИТЕЛЬНЫХ КОГНИТИВНЫХ И ПСИХОЭМОЦИОНАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ

### Обзор

© 2021 Г.Т. Шишкина<sup>1\*</sup>, Т.С. Калинина<sup>1</sup>, Н.В. Гуляева<sup>2</sup>,  
Д.А. Ланшаков<sup>1</sup>, Н.Н. Дыгало<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН»,  
600090 Новосибирск, Россия; электронная почта: gtshi@bionet.nsc.ru

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН»,  
117485 Москва, Россия

Поступила в редакцию 14.10.2020

После доработки 23.12.2020

Принята к публикации 09.01.2021

Поражения мозга при фокальной ишемии/инсульте сопровождаются длительными изменениями экспрессии генов в гиппокампе – лимбической структуре мозга, участвующей в регуляции ключевых аспектов высшей нервной деятельности, включая когнитивные функции и эмоции. Задействованные при этом гены и соответственно кодируемые ими белки принципиальны для формирования индуцируемых ишемией отсроченных психоэмоциональных и когнитивных нарушений. Центральным фактором, обуславливающим постинсультные последствия, может являться индуцированная ишемией активация нейровоспаления в гиппокампе. Исследование динамики изменений экспрессии генов в гиппокампе после ишемии мозга является важным шагом к пониманию молекулярных путей, ответственных за развитие постинсультных когнитивных и психических патологий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** фокальное повреждение мозга, нейровоспаление, гиппокамп, экспрессия генов, ослабление когнитивной функции, депрессия.

DOI: 10.31857/S032097252106004X

### ВВЕДЕНИЕ

Острые нарушения мозгового кровообращения часто приводят к ухудшению когнитивных функций, а также развитию психических расстройств, таких как депрессия и тревожность [1–4]. Эти сопутствующие инсульту патологии представляют не только самостоятельную проблему, но и оказывают значительное негативное влияние на успешность постинсультной реабилитации, увеличивают инвалидизацию и смертность больных [5, 6]. Несмотря на особенные пути развития и специфику этих патологий по сравнению, например, с классическим большим депрессивным расстройством [4], применение традиционных антидепрессантов оказалось эф-

фективно для увеличения продолжительности жизни пациентов в среднем на 10 лет [2]. Выяснение механизмов постинсультных патологий будет способствовать идентификации потенциальных терапевтических мишеней, необходимых для разработки новых эффективных стратегий направленной терапии психических расстройств.

Ведущую роль в запоминании и обучении, а также формировании психоэмоциональных состояний отводят гиппокампу. В частности, нейрогенез в субгранулярной зоне связывают как с когнитивными, так и с психоэмоциональными функциями. В связи с этим вторичное (отсроченное) повреждение этой структуры при инсульте может иметь ключевое значение для развития постинсультных когнитивных расстройств и психических патологий [7, 8]. Молекулярные механизмы отсроченных когнитивных и психических расстройств после ишеми-

Принятые сокращения: LPS – липополисахарид; МСАО – окклюзия средней мозговой артерии.

\* Адресат для корреспонденции.

ческих повреждений мозга могут включать длительные изменения экспрессии генов в ключевых структурах мозга, включающих лимбическую систему и, в первую очередь, гиппокамп. Селективная чувствительность гиппокампа животных к развитию нейровоспаления была описана при различных экстремальных воздействиях [9]. С другой стороны, в исследованиях на животных введение индуцирующего нейровоспаление бактериального липополисахарида (lipopolysaccharide, LPS) приводило к ослаблению когнитивных функций [10] и изменению экспрессии генов в гиппокампе [11] в отдаленные периоды после введения эндотоксина. Это позволяет рассматривать факторы нейровоспаления в качестве ключевых посредников между ишемией и отсроченными изменениями экспрессии генов, важных в патогенезе постинсультных патологий. Целью данного обзора явился сравнительный анализ имеющихся в литературе экспериментальных данных об острых и отдаленных изменениях экспрессии генов в гиппокампе после ишемического инсульта и активации нейровоспаления с отдаленными когнитивными и психоэмоциональными последствиями.

### МОДЕЛИРОВАНИЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ И НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ НА ГРЫЗУНАХ

Исследования клеточных и молекулярных механизмов постинсультных психических и когнитивных нарушений проводят в модельных экспериментах на животных, имитирующих эти патологические состояния. Среди вызывающих ишемию экспериментальных воздействий — тромбоз, применение сосудосуживающих препаратов, например, эндотелина-1, и др. [12]. У человека почти 85% инсультов связаны с ишемическими повреждениями [2], являющимися в большинстве случаев следствием окклюзии средней мозговой артерии (middle cerebral artery occlusion, МСАО), поэтому транзиторная МСАО относится к наиболее частому способу экспериментального провоцирования инсульта на грызунах. На крысах с использованием модели МСАО было показано, что фокальное ишемическое повреждение неокортекса уже в первые дни запускает накопление кортикостерона и интерлейкина IL-1 $\beta$  в гиппокампе с большей выраженностью эффекта в его вентральной области [13]. Сопоставление результатов с динамикой кортикостерона в крови после МСАО позволило предположить, что одним из факторов отсроченного повреждения гиппокампа мо-

жет быть избыток циркулирующего кортикостерона, взаимодействующего с рецепторами в гиппокампе. Среди обсуждаемых причин отдаленных постинсультных психических патологий, прежде всего депрессии, рассматривают вклад стресса, индуцируемого ослаблением физического состояния и вынужденной социальной изоляцией перенесших инсульт пациентов [2]. В связи с этим в некоторых случаях при моделировании сопутствующих патологий на животных, помимо МСАО, используют дополнительное воздействие стрессоров [14, 15].

Ишемические повреждения сопровождаются активацией периферической и центральной иммунных систем. Согласно некоторым данным, имеющиеся модели патологии недостаточно полно отражают активацию периферической иммунной системы. К примеру, у человека после инсульта меняется экспрессия значительного числа генов, в то время как вариации экспрессии мышечных ортологов оказались близки к случайным, что, по мнению авторов, обусловлено различиями в лейкоцитарном составе крови человека и грызунов [16]. Помимо расширения способов провоцирования экспериментального инсульта, для выяснения роли провоспалительных процессов в формировании отсроченных постинсультных психопатологий необходимо использовать методы специфической активации этих процессов. Наиболее часто с этой целью используют как периферическое, так и центральное введение LPS [17–19]. Хотя в настоящее время сходство молекулярных механизмов поведенческих изменений, вызываемых LPS у животных и человека, остается неясным, введение эндотоксина все же считают полезной методикой, позволяющей моделировать индуцированные нейровоспалением изменения в центральной нервной системе, связанные с развитием патологий [19].

С целью определения механизмов развития постинсультных патологий и расширения возможных путей терапевтических вмешательств ведутся активные поиски молекулярных нейробиологических коррелятов психопатологических проявлений. Анализ экспрессии генов в ЦНС в разные периоды после ишемического воздействия безусловно способствует выявлению ключевых звеньев патологического процесса и терапевтических мишеней. Изучение экспрессии генов в гиппокампе в отсроченном от ишемии периоде проводятся в основном для отдельных генов. Использование полногеномного транскриптомного анализа этой структуры ограничено преимущественно ранними сроками после экспериментального воздействия. Для изучения роли нейровоспаления в отсроченных

изменениях экспрессии генов может быть информативен сравнительный анализ результатов после ишемии и LPS.

### **БЫСТРЫЕ ОТВЕТЫ ГИППОКАМПА НА ИШЕМИЧЕСКОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ**

Полагают, что развивающиеся в области непосредственного ишемического поражения процессы, включающие повышенную продукцию активных форм кислорода, оксида азота, глутаматергическую эксайтотоксичность, а также нейровоспаление усиливают повреждающее действие инсульта на клетки в области поражения и распространяют это влияние на структуры, не получающие кровоснабжение через поврежденную артерию. Появление после экспериментального инсульта активированных микроглиальных клеток в гиппокампе преимущественно в СА3-области и зубчатой извилине [20] служит, по мнению авторов, определенным свидетельством связи активации этих клеток с повреждением энторинальной коры и последующим вовлечением волокон перфорантного пути из энторинальной коры в гиппокамп, а также комиссуральных волокон гиппокампа.

**Механизмы повреждающего действия ишемии на клетки гиппокампа.** Ключевую роль в повреждении нейронов гиппокампа после ишемии отводят повышению уровня внеклеточного глутамата с последующей гипертрофированной активацией NMDA (N-метил-D-аспартат) рецепторов, что обуславливает массивное поступление в клетки ионов кальция. Уровень внеклеточного глутамата в этой структуре, как было установлено на крысах с использованием микродиализа, начинает увеличиваться с первых минут ишемического воздействия [21]. Первые свидетельства так называемой отсроченной гибели нейронов в этой структуре обнаруживаются позже, чем в коре и стриатуме [22], как правило, между 12 часами и 7 днями после ишемии с пиковыми значениями на 4-й день [23]. Как показано в ряде работ на крысах, через сутки после МСАО в гиппокампе могут фиксироваться отчетливые признаки индукции апоптоза [24]. На гибель клеток гиппокампа по такому пути указывают и выявленное в эти же сроки снижение экспрессии гена антиапоптозного белка Bcl-2 и, напротив, увеличение экспрессии гена проапоптозного белка BAX [25]. В то же время в гиппокампе растет экспрессия белка исполнительной протеазы апоптоза каспазы-3 [22, 26]. Увеличению количества апоптотических клеток сопутствуют выраженные изменения в экспрессии мРНК субъединиц NMDA-рецепторов [27].

В период эксайтотоксического поражения клетки подвергаются быстрому набуханию, которое может приводить к противодействующей этому процессу активации анионных каналов VRACs (volume-regulated anion channels). Эти каналы характеризуются способностью напрямую высвобождать глутамат. Последний, оказывая дополнительное активирующее влияние на NMDAR, способен усугублять повреждение нейронов, как было недавно обнаружено в области СА1 гиппокампа мышей после МСАО [28]. В связи с дисфункцией глутаматергической нейротрансмиссии важен также ответ астроцитов на ишемию. Их функция, в частности, связана с удалением из экстраклеточного пространства высвободившегося глутамата, что должно ослаблять его эксайтотоксическое действие. Активность астроцитов после инсульта увеличивается, однако из-за значительного усиления в этих условиях синтеза кальций-связывающего белка S100B результат может оказаться негативным. Белок S100B, экспрессирующийся преимущественно в астроцитах, в низких концентрациях оказывает положительное влияние на клетки мозга; высокие же его концентрации приводят к снижению синтеза обладающего антиоксидантной активностью глутатиона и транспортера глутамата. Возникающая в результате этого недостаточность обратного захвата глутамата вызывает его накопление в межклеточном пространстве, что способствует усилению гибели нейронов. Угнетение синтеза S100B повышало антиоксидантную защиту и улучшало выживаемость нейронов после инсульта [29]. Транскриптомный анализ, проведенный через сутки после МСАО, выявил увеличение экспрессии другого гена из группы кальций-связывающих белков (S100) – S100a9 (кальгранулин В), значение которого остается пока неясным [26].

В числе механизмов индуцируемой ишемией гибели нейронов гиппокампа стоит также отметить активируемое МСАО увеличение уровня белка VPS4B (vacuolar protein sorting-associated protein 4B). Этот белок локализуется преимущественно в цитоплазме нейронов и относится к группе транспортных аденозинтрифосфатаз, связанных с секрецией и интернализацией экзосом, внутриклеточным транспортом белков и клеточной пролиферацией. В области СА1 гиппокампа увеличение уровня белка VPS4B достигало пикового значения через 3 дня после МСАО и сопровождалось достоверным увеличением экспрессии активной каспазы-3, локализованной в клетках совместно с VPS4B [30]. Авторы на культуре клеток РС12 продемонстрировали, что подавление экспрессии VPS4B с по-

мощью интерферирующей РНК (siRNA) приводило к снижению уровня активной каспазы-3 и снижало индуцированную недостатком кислорода и глюкозы клеточную гибель.

**Активация нейровоспаления.** Продукты гибели клеток мозга, вызванной ишемией, например, гиалуроновая кислота, белок группы 1 высокой подвижности (high-mobility group box 1 protein), мРНК, белки теплового шока и др., активируют мембранные Toll-подобные (TLR) рецепторы с последующей стимуляцией высвобождения различных провоспалительных цитокинов, включающих TNF- $\alpha$  (фактор некроза опухоли), IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN [31]. Индуцированное нейровоспаление проявляется морфологической амебоидной трансформацией микроглии, резидентных иммунных клеток мозга, а также вторичным повышением уровней провоспалительных цитокинов, продуцируемых как микроглией, так и астроцитами в ЦНС [32].

Активированные микроглиальные клетки обнаруживаются в гиппокампе крыс со второго дня после МСАО [20]. Следует отметить, что микроглия выполняет в ЦНС двойную функцию [33]. Важная роль связана с нейропротекцией, которую клетки осуществляют посредством выработки противовоспалительных цитокинов и нейротрофических факторов, прежде всего BDNF (brain-derived neurotrophic factor), способствующего, как было показано, выживаемости нейронов в области пенумбры [34]. Помимо экспрессии BDNF, в нейропротективной функции микроглии участвует также содержащий субъединицу  $\alpha 7$  никотиновый ацетилхолиновый рецептор, высокая экспрессия которого при нейровоспалении важна для выживаемости нейронов [35]. Следует отметить, что в условиях нейровоспаления повышается низкая в норме защитная фагоцитарная способность микроглии. При этом полагают, что гиперактивация или хроническая активация микроглии приводит к потере ею классической нейропротективной функции, проявляющейся также ослаблением ее роли в формировании и ремоделировании синапсов, что служит одной из причин инициации развития нейродегенеративных заболеваний, в том числе с нарушением психических и когнитивных функций [32]. Одним из ключевых транскрипционных факторов, иницирующих провоспалительный цитокиновый ответ микроглии на ишемию и LPS в мозге, является NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) [36]. Этот фактор наряду с другим транскрипционным фактором CREB (cAMP response element-binding protein) полагают ответственным за переключение фенотипов микроглиальных клеток, связанных с продукцией провоспалительных

цитокинов (M1) и нейротрофических факторов (M2) [37].

**Изменение экспрессии генов.** Транскрипционный анализ, проведенный с помощью ДНК-микрочипов или секвенирования РНК в гиппокампе в первые часы (через 4,5–6 ч), а также через сутки после МСАО, выявил соответствие изменений экспрессии генов с клеточными и нейробиологическими событиями. Методические особенности в опубликованных работах включают разную продолжительность окклюзии, например, в течение 90, 120 или 180 мин, а также объем и состав образцов, например, исследование гиппокампа отдельно [25] или в комплексе с другими подкорковыми структурами [26]. Тем не менее представленные в этих исследованиях результаты продемонстрировали общую тенденцию в изменении экспрессии ряда генов, относящихся, прежде всего, к гибели клеток и активации нейровоспаления [24–26, 38].

Число генов с варьированной экспрессией в гиппокампе значительно увеличивалось в промежутке времени между первыми часами и сутками после ишемии-реперфузии, например, между 4,5 и 24 ч – от 469 до 1939 генов [26]. Обнаружены также значительные различия между этими временными точками по составу генов с измененной экспрессией, а также, вероятно, по физиологическому смыслу этих изменений. Например, в первые часы отмечено повышение экспрессии генов сигнального каскада HIF (hypoxia-inducible factor), в частности HIF-1. Учитывая классическое влияние HIFs, способствующее экспрессии генов фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и гликолитических ферментов, указанное повышение экспрессии может быть важным для поддержания метаболизма в обедненных ресурсами условиях и отражать быструю активацию адаптивных ответов на повреждение. Выраженным снижением экспрессии в первые часы характеризовались гены, связанные с фосфорилированием белков [38]. Гены, изменение экспрессии которых было наиболее значительным через сутки после ишемии-реперфузии, участвуют в воспалении, окислительном фосфорилировании, стрессе эндоплазматического ретикулума, апоптозе, аутофагии и различных метаболических процессах.

Были опубликованы различия транскрипционного профиля между отдельными областями гиппокампа (CA1 и CA3) у интактных мышей [39]. Через сутки после ишемии/гипоксии региональные различия в экспрессии большинства генов экспериментальных животных оказались менее выраженными, что, по мнению авторов, связано с общей активацией транскрипции. Список генов, чья экспрессия претерпела изме-



нения в обеих областях, как и в процитированных выше работах, включал гены провоспалительных факторов и гены, вовлекаемые в ответы на стрессоры. Среди наиболее значительных событий в ранний период после ишемии — гибель клеток и активация нейровоспаления.

### РОЛЬ НЕЙРОВОСПАЛЕНИЯ В ПОСТИНСУЛЬТНЫХ НАРУШЕНИЯХ

Постинсультные психические патологии часто связаны с когнитивными нарушениями и расстройствами настроения [1–4]. Поскольку гиппокампу отводят важную роль в обработке пространственной информации и формировании памяти, а также в контроле психоэмоционального состояния, значительное внимание исследователей направлено на выяснение роли изменений в гиппокампе, включая нейровоспаление, в механизмах этих последствий инсульта.

Постинсультные когнитивные нарушения проявляются ослаблением памяти, снижением внимания, дисфункцией речи. В исследованиях на грызунах уменьшение нейровоспаления в гиппокампе после МСАО сопровождалось улучшением когнитивных функций животных, например, после использования обогащенной внешней среды [40] или введения инсулиноподобного фактора роста 1 [41]. Напротив, активация нейровоспаления введением LPS приводила к ослаблению памяти, причем этот эффект, наблюдаемый через 7 дней [42] и даже 10 месяцев [43] после однократного введения эндотоксина, достоверно коррелировал с повышенными уровнями провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  в гиппокампе.

Связь провоспалительных факторов с развитием депрессии и тревожности подтверждается многочисленными клиническими наблюдениями, включающими развитие психопатологии у психически здоровых добровольцев после провоспалительного стимула LPS [44], при терапии провоспалительными цитокинами [45], а также в условиях хронических воспалительных заболеваний [46]. В экспериментальных исследованиях через 24 ч после однократного или хронического периферического введения LPS животные проявляли отчетливые признаки депрессивно-подобного поведения [47] и повышенной тревожности [48, 49]. Трехкратное введение LPS в желудочки мозга в течение 5-ти дней также приводило к развитию депрессивно-подобного состояния через сутки после последнего введения. В данном случае индукция воспаления также была ассоциирована с повышением уровней мРНК TNF- $\alpha$  и IL-1 $\beta$  в гиппокампе [50]. Подав-

ление экспрессии IL-1 $\beta$  в гиппокампе введением вирусного вектора, кодирующего шпилечную РНК к транскрипту этого интерлейкина, ослабляло депрессивно-подобное поведение, снижало повышенную тревожность и купировало нарушение памяти, индуцированные LPS [51]. В экспериментах на ишемизированных мышцах введение тетрациклинового антибиотика миноциклина противодествовало нейровоспалению, а вместе с ним — и индукции у животных депрессивно-подобного поведения и повышению тревожности [52].

Несмотря на то что имеющиеся данные указывают на нейровоспаление как важный фактор патогенеза постинсультных нарушений, конкретные молекулярные механизмы, посредством которых провоспалительные факторы воздействуют на когнитивные и психоэмоциональные функции, остаются не до конца ясными. Изучение экспрессии генов и их белковых продуктов в гиппокампе в отдаленные сроки после ишемического воздействия выявляют многочисленные изменения, в частности, связанные с иммунной и нейротрансмиттерными системами, воспалением, нейродегенерацией, нейропротекцией, метаболизмом липидов, внутри- и межклеточными сигнальными процессами и рядом других клеточных функций [53]. В развитии постинсультных патологий важную роль играет накопление  $\beta$ -амилоида и увеличение фосфорилирования тау-белка, ослабление нейропластичности и развитие нейродегенерации, а также изменения активности серотонинергической системы.

**Бета-амилоид и тау-белок.** Среди причин длительно проявляющихся после ишемии признаков нейровоспаления рассматривают спровоцированное первоначальной активацией нейровоспалительных процессов постишемическое накопление  $\beta$ -амилоида и тау-белка в клетках гиппокампа [54]. Исследования, проведенные на животных в период между 2-м и 30-м днями после ишемии-реперфузии, продемонстрировали дисрегуляцию экспрессии генов предшественника амилоидного белка,  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -секретазы, а также гена тау-белка [55]. Накопление в мозге  $\beta$ -амилоида и увеличение фосфорилирования тау-белка [56], характерное при болезни Альцгеймера, некоторые исследователи [54, 57] связывают с прогрессирующим снижением когнитивных функций после инсульта. Если через 3 мес. после ишемического поражения у 17–92% пациентов диагностировали в основном легкие когнитивные нарушения, то к 25-му году после инсульта доля людей с деменцией увеличивалась до 48%, согласно данным проспективного исследования [1]. В экспериментах на животных ослабление когнитивных функций, оцененное

спустя 14 дней после МСАО, сопровождалось увеличением фосфорилирования тау-белков pT205 и pS396 в гиппокампе [41].

Проявление признаков воспаления и нейродегенеративных изменений, накопление  $\beta$ -амилоида и фосфорилирование тау-белка, согласно имеющимся данным, тесно связаны с когнитивными нарушениями и деменцией [54]. Нейровоспаление индуцирует накопление амилоида путем его повышенного образования из белка-предшественника с помощью ферментов секретаз и/или в результате сниженного выведения через различные системы, включая глимфатическую [57]. Помимо нейровоспаления, накопление тау-белка после ишемического повреждения может быть связано и с другими процессами, среди которых активация глутаматергической системы. Увеличение количества гиперфосфорилированного тау-белка в гиппокампе, зафиксированное на 10-й день после МСАО, не происходило при нарушении глутаматергического пути из энторинальной коры в гиппокамп [56].

Повышение экспрессии генов  $\beta$ -амилоида и тау-белков ассоциируют с механизмом индукции нейродегенерации, которую считают ответственной за ослабление когнитивных функций. Анализ гиппокампа у пациентов с деменцией после ишемии выявил, например, значительное уменьшение объемов нейронов и их плотности в СА1-области [58]. Вместе с тем в настоящее время недостаточно данных относительно вклада амилоидной патологии в постинсультную нейродегенерацию и когнитивные нарушения. Если на животных моделях продемонстрирована связь между постинсультным воспалением и накоплением амилоида, то на людях такая связь, в том числе и для гиппокампа, остается не изученной. Недавно была предпринята попытка исследования пациентов, перенесших инсульт и страдающих снижением когнитивных функций, с целью обнаружения связи между постинсультным нейровоспалением, отложением  $\beta$ -амилоида и нейродегенерацией в областях коры. Однако в данном исследовании, проведенном на пациентах через 7 лет после инсульта, явная связь между этими параметрами не была выявлена [59], что обуславливает необходимость дальнейших исследований, в том числе и на молекулярно-генетическом уровне.

**Нейрогенез и регуляторы нейропластичности.** Нейродегенерация, связываемая с постинсультными когнитивными и психоэмоциональными нарушениями, может также являться следствием дисфункции нейрональной пластичности, важная роль в регуляции которой принадлежит нейротрофическим факторам, прежде всего

BDNF. Снижение обучаемости и памяти взрослых крыс через 4 недели после МСАО сопровождалось нарушением структуры синапсов и снижением числа синаптических везикул, однако этим структурным нарушениям сопутствовали повышенные после ишемии уровни BDNF в гиппокампе. Экспрессия NMDAR1 была, напротив, значительно ниже контрольных уровней [60]. Изменение экспрессии BDNF может зависеть от времени исследования после инсульта, а также воздействия дополнительных стрессовых факторов. Например, у взрослых мышей усиление депрессивно-подобного поведения и ослабление когнитивной функции через 5–10 недель после МСАО и хронического стресса сопровождалось снижением экспрессии BDNF в гиппокампе [61].

Во взрослом гиппокампе важным для обеспечения сложных процессов памяти является уровень нейрогенеза, который в субгранулярной нейрогенной нише происходит в течение всей жизни. В экспериментальных исследованиях ухудшение памяти в процессе старения было количественно связано со снижением скорости нейрогенеза [62]. Парадоксально, но экспериментальные исследования на мышях после инсульта показывают усиление гиппокампального нейрогенеза, сохранявшегося и через месяц после воздействия и коррелировавшего с нарушением контекстной и пространственной памяти животных [63]. Активация нейрогенеза зависела от продолжительности ишемического воздействия, например, была более значительной через 28 дней после 2-часовой по сравнению с 30-минутной МСАО, но не зависела от масштаба гибели клеток в гиппокампе или степени повреждения коры [64]. Многие исследователи полагают, что, несмотря на активацию, постинсультный нейрогенез в гиппокампе может быть aberrантным как функционально, так и структурно. Так, одной из причин дефицита памяти может быть измененная по сравнению с нормой морфология новообразовавшихся гранулярных клеток [65]. Кроме того, показано, при инсульте может происходить сдвиг нейрогенеза от нейронеогенеза в сторону астроглиогенеза [66], теоретически способствующего увеличению количества астроцитов и провоспалительных цитокинов. Нейрогенез контролируется многочисленными регуляторами, включающими глюкокортикоиды, нейротрофины, нейротрансмиттеры, эпигенетические факторы – изменение их активности может лежать в основе наблюдаемого после инсульта aberrантного нейрогенеза и сопутствующего ослабления памяти. Усиление нейрогенеза, наблюдаемое в зубчатой извилине взрослых крыс через 28 дней после 2-часовой МСАО, свя-

зывают, в частности, с глутаматергическими механизмами, что подтверждается полным ингибированием этого усиления антагонистами NMDA-рецепторов [64].

**Серотонинергическая система.** Важный вклад в продепрессивные эффекты провоспалительных цитокинов вносит сдвиг метаболизма триптофана с серотонинергического на кинурениновый путь в результате активации фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO) [47]. Периферическое введение LPS, наряду с индукцией депрессивно-подобного поведения, активировало IDO [67]. Такой метаболический сдвиг вызывает недостаток триптофана для синтеза серотонина, что приводит к снижению содержания нейромедиатора в мозге и ослаблению серотонинергического сигнала — фактора риска депрессивных расстройств [68, 69]. Данная перестройка также ведет к накоплению играющих самостоятельную роль в патогенезе депрессии метаболитов кинуренина, прежде всего, хинолиновой кислоты [70]. Эта кислота является агонистом NMDA-рецепторов и через увеличение концентрации внеклеточного глутамата — как стимуляцией его высвобождения, так и блокадой обратного захвата астроцитами — способствует эксайтотоксичности [71]. Следует отметить, что у мышей, лишенных GluN2A-субъединицы NMDAR в префронтальной коре и гиппокампе, не наблюдалось депрессивно-подобного поведения в ответ на введение LPS [72]. В ряде работ отмечается вклад сдвига метаболизма триптофана с серотонинергического на кинурениновый путь в развитие постинсультных нарушений. Например, развитие депрессивно-подобного состояния и ослабление памяти через 5–10 недель после МСАО и стресса, вызванного ограничением подвижности, происходило на фоне увеличения экспрессии IDO1 в активированных микроглиальных клетках в разных отделах мозга, включая гиппокамп [73]. Таким образом, повышенная продукция провоспалительных цитокинов после ишемии мозга может запускать и усиливать патологический каскад — активацию IDO, особенно в лимбической и паралимбической областях, а также развитие постинсультной депрессии [73].

#### АКТИВАЦИЯ НЕЙРОВосПАЛЕНИЯ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ФАКТОР ДЛИТЕЛЬНОЙ ИНДУКЦИИ ГЕНОВ ГИППОКАМПА

Нейровоспаление в гиппокампе может сохраняться длительное время после ишемии. По-

вышенное количество микроглиальных клеток в гиппокампе крыс отмечено также и на 7-й день исследования после МСАО, а через 28 дней в гиппокампе этих животных было достоверно увеличено содержание IL-1 $\beta$  и число IL-1 $\beta$ -позитивных клеток [40]. Повышенное число активированных астроцитов и микроглиальных клеток в гиппокампе крыс наблюдалось даже через 2 года после 10-минутной глобальной ишемии [54]. Определенный вклад в длительную активацию нейровоспаления могут вносить цитозольные рецепторы NLR (nucleotide-binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors). В недавней работе [74] было обнаружено, что МСАО сопровождалась значительным повышением уровней мРНК и белка Nlrp10, зарегистрированных через 7, 14 и 28 дней в области пенумбры. Связь повышения Nlrp10 с развитием нейровоспаления в гиппокампе подтверждается ослаблением активации глиальных клеток при ишемии у мышей-нокаутов по *Nlrp10*. Ослабление активации проявлялось сниженным по сравнению с животными дикого генотипа числом GFAP- и Iba-1-позитивных клеток (маркерные белки астроцитов и микроглии соответственно), а также мРНК провоспалительных цитокинов и хемокинов через неделю после МСАО. При инкубации с LPS астроциты нокауты по *Nlrp10* демонстрировали ослабленные ответы сигнальных путей TLR-4/NF- $\kappa$ B и NLRP12/ASC/Caspase-1 на эндотоксин.

Временные изменения параметров нейровоспаления после введения LPS имеют сходные черты с таковыми, наблюдаемыми после МСАО. Например, как и после ишемии, достоверная активация микроглии в гиппокампе мышей после однократного периферического введения эндотоксина (1–2 мг/кг) также наблюдалась через 1–2 суток [32, 75]. Как и после МСАО, при введения LPS признаки активации нейровоспаления сохранялись длительное время. Анализ ответа микроглии на внутригиппокампальное введение LPS (10 мкг) показал увеличение числа активированных микроглиальных клеток во все исследованные после введения эндотоксина периоды: 6 и 24 ч, 1 и 4 недели [76].

Даже относительно непродолжительная индукция воспаления может приводить к длительной дисрегуляции экспрессии генов в мозге. В гиппокампе взрослых самцов мышей через 3 мес. после последней из пяти инъекций LPS (250 мкг/кг, проводились в течение двух недель) обнаружено изменение экспрессии 230 генов, для 183 из которых она была достоверно повышена и для 47 — снижена [10]. Среди генов с наиболее заметным снижением экспрессии оказа-

лись гены белков раннего ответа и транскрипционных факторов (Egr2, Fosb, Fos, Npas4, Egr4, Junb), иммунного сигналинга (Ccl3) и транскрипции (Btg2). Среди генов с максимальной повышенной экспрессией можно отметить ген транстиретина (Ttr), предположительно, участвующего в развитии амилоидоза [77] и окислительного стресса [78]. В целом же, данные транскриптомного анализа указывают на то, что как возникновение, так и поддержание постинсультных нарушений могут обеспечиваться индукцией длительных изменений экспрессии генов, вовлекаемых в контроль когнитивных и психоэмоциональных функций, а также регуляторов их транскрипционной активности. На такую возможность указывает ослабление памяти, отмечаемое у грызунов через 3 мес. после введения LPS в умеренной дозе (250 мкг/кг, 5 инъекций, 1 раз в три дня) [11] или через 5 мес. после однократного введения эндотоксина в более высокой (1 мг/кг) дозе [79]. Однако проверка этого предположения требует специальных экспериментальных исследований.

Накапливающиеся данные свидетельствуют о важной роли нейровоспаления в патогенезе инсульта и его возможной роли в провоцировании и поддержании постинсультного ослабления когнитивных функций и развития психиатрических расстройств путем изменения экс-

прессии регуляторных генов в гиппокампе. Это позволяет рассматривать нейровоспаление как потенциальную мишень для терапевтического вмешательства. Вместе с тем, как отмечают некоторые исследователи [33], необходимо выяснение роли нейровоспаления на разных этапах после ишемии, поскольку резидентные иммунные клетки мозга способны оказывать как негативное, так и положительное влияние на выживаемость нейронов. В частности, воздействия, направленные на угнетение активности клеток микроглии в неподходящие сроки, могут ухудшить течение заболевания. В этой связи обнаружение изменений экспрессии генов после ишемии и исследование динамики этих изменений в гиппокампе являются необходимым первым шагом к пониманию молекулярных путей, ответственных за развитие постинсультных когнитивных и психических патологий.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-64-47013) и бюджетного проекта № 0259-2021-0015.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Brainin, M., Tuomilehto, J., Heiss, W. D., Bornstein, N. M., Bath, P. M., et al. (2015) Post-stroke cognitive decline: an update and perspectives for clinical research, *Eur. J. Neurol.*, **22**, 229-238, doi: 10.1111/ene.12626.
- Robinson, R. G., and Jorge, R. E. (2016) Post-stroke depression: a review, *Am. J. Psychiatry*, **173**, 221-231, doi: 10.1176/appi.ajp.2015.15030363.
- Pedroso, V. S. P., Brunoni, A. R., Vieira, É. L. M., Jorge, R. E., Lauterbach, E. C., and Teixeira, A. L. (2018) Early psychiatric morbidity in a Brazilian sample of acute ischemic stroke patients, *Clinics (Sao Paulo)*, **73**, e55, doi: 10.6061/clinics/2018/e055.
- Baccaro, A., Wang, Y. P., Candido, M., Conforto, A. B., Brunoni, A. R., et al. (2019) Post-stroke depression and cognitive impairment: study design and preliminary findings in a Brazilian prospective stroke cohort (EMMA study), *J. Affect. Disord.*, **245**, 72-81, doi: 10.1016/j.jad.2018.10.003.
- De Mello, R. F., Santos, I. S., Alencar, A. P., Bensenor, I. M., Lotufo, P. A., and Goulart, A. C. (2016) Major depression as a predictor of poor long-term survival in a Brazilian stroke cohort (study of stroke mortality and morbidity in adults) EMMA study, *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, **25**, 618-625, doi: 10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2015.11.021.
- Paolucci, S., Iosa, M., Coiro, P., Venturiero, V., Savo, A., et al. (2019) Post-stroke depression increases disability more than 15% in ischemic stroke survivors: a case-control study, *Front. Neurol.*, **10**, 926, doi: 10.3389/fneur.2019.00926.
- Gulyaeva, N. V. (2019) Biochemical mechanisms and translational relevance of hippocampal vulnerability to distant focal brain injury: the price of stress response, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1306-1328, doi: 10.1134/S0006297919110087.
- Gulyaeva, N. V. (2019) Functional neurochemistry of the ventral and dorsal hippocampus: stress, depression, dementia and remote hippocampal damage, *Neurochem. Res.*, **44**, 1306-1322, doi: 10.1007/s11064-018-2662-0.
- Piskunov, A., Stepanichev, M., Tishkina, A., Novikova, M., Levshina, I., and Gulyaeva, N. (2016) Chronic combined stress induces selective and long-lasting inflammatory response evoked by changes in corticosterone accumulation and signaling in rat hippocampus, *Metab. Br. Dis.*, **31**, 445-454, doi: 10.1007/s11011-015-9785-7.
- Tchessalova, D., and Tronson, N. C. (2020) Enduring and sex-specific changes in hippocampal gene expression after a subchronic immune challenge, *Neuroscience*, **428**, 76-89, doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.12.019.
- Tchessalova, D., and Tronson, N. C. (2019) Memory deficits in males and females long after subchronic immune challenge, *Neurobiol. Learn. Mem.*, **158**, 60-72, doi: 10.1016/j.nlm.2019.01.003.
- Fluri, F., Schuhmann, M. K., and Kleinschnitz, C. (2015) Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research, *Drug Des. Dev. Ther.*, **9**, 3445-3454, doi: 10.2147/DDDT.S56071.
- Onufriev, M. V., Freiman, S. V., Moiseeva, Yu. V., Stepanichev, M. Yu., Lazareva, N. A., and Gulyaeva, N. V.

- (2017) Accumulation of corticosterone and interleukin-1 $\beta$  in the hippocampus after focal ischemic damage of the neocortex: selective vulnerability of the ventral hippocampus, *Neurochem. J.*, **11**, 236-241, doi: 10.1134/S1819712417030084.
14. Kronenberg, G., Gertz, K., Heinz, A., and Endres, M. (2014) Of mice and men: modelling post-stroke depression experimentally, *Br. J. Pharmacol.*, **171**, 4673-4689, doi: 10.1111/bph.12775.
  15. Xu, Y., and Liang, L. (2020) Vitamin D3/vitamin D receptor signaling mitigates symptoms of post-stroke depression in mice by upregulating hippocampal BDNF expression, *Neurosci. Res.*, doi: 10.1016/j.neures.2020.08.002.
  16. Sharp, F. R., and Jickling, G. C. (2014) Modeling immunity and inflammation in stroke: differences between rodents and humans? *Stroke*, **45**, e179-180, doi: 10.1161/STROKEAHA.114.005639.
  17. Stepanichev, M., Dygalo, N. N., Grigoryan, G., Shishkina, G. T., and Gulyaeva, N. (2014) Rodent models of depression: neurotrophic and neuroinflammatory biomarkers, *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 932757, doi: 10.1155/2014/932757.
  18. Zhan, X., Cox, C., Ander, B. P., Liu, D., Stamova, B., et al. (2015) Inflammation combined with ischemia produces myelin injury and plaque-like aggregates of myelin, amyloid- $\beta$  and A $\beta$ PP in adult rat brain, *J. Alzheimer's Dis.*, **46**, 507-523, doi: 10.3233/JAD-143072.
  19. Lasselin, J., Schedlowski, M., Karshikoff, B., Engler, H., Lekander, M., and Konsman, J. P. (2020) Comparison of bacterial lipopolysaccharide-induced sickness behavior in rodents and humans: relevance for symptoms of anxiety and depression, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **115**, 15-24, doi: 10.1016/j.neubiorev.2020.05.001.
  20. Morioka, T., Kalehua, A. N., and Streit, W. J. (1993) Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain, *J. Comp. Neurol.*, **327**, 123-132, doi: 10.1002/cne.903270110.
  21. Yang, Y., Li, Q., Miyashita, H., Yang, T., and Shuaib, A. (2001) Different dynamic patterns of extracellular glutamate release in rat hippocampus after permanent or 30-min transient cerebral ischemia and histological correlation, *Neuropathology*, **21**, 181-187, doi: 10.1046/j.1440-1789.2001.00397.x.
  22. Mrsic-Pelcic, J., Pilipovic, K., Pelcic, G., Vitezic, D., and Zupan, G. (2017) Decrease in oxidative stress parameters after post-ischaemic recombinant human erythropoietin administration in the hippocampus of rats exposed to focal cerebral ischaemia, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **121**, 453-464, doi: 10.1111/bcpt.12833.
  23. Butler, T. L., Kassed, C. A., Sanberg, P. R., Willing, A. E., and Pennypacker, K. R. (2002) Neurodegeneration in the rat hippocampus and striatum after middle cerebral artery occlusion, *Brain Res.*, **929**, 252-260, doi: 10.1016/s0006-8993(01)03371-6.
  24. Chung, J. Y., Yi, J. W., Kim, S. M., Lim, Y. J., Chung, J. H., and Jo, D. J. (2011) Changes in gene expression in the rat hippocampus after focal cerebral ischemia, *J. Korean Neurosurg. Soc.*, **50**, 173-178, doi: 10.3340/jkns.2011.50.3.173.
  25. Wang, C., Liu, M., Pan, Y., Bai, B., and Chen, J. (2017) Global gene expression profile of cerebral ischemia-reperfusion injury in rat MCAO model, *Oncotarget*, **8**, 74607-74622, doi: 10.18632/oncotarget.20253.
  26. Dergunova, L. V., Filippenkov, I. B., Stavchansky, V. V., Denisova, A. E., Yuzhakov, V. V., et al. (2018) Genome-wide transcriptome analysis using RNA-Seq reveals a large number of differentially expressed genes in a transient MCAO rat model, *BMC Genomics*, **19**, 655, doi: 10.1186/s12864-018-5039-5.
  27. Liu, Z., Zhao, W., Xu, T., Pei, D., and Peng, Y. (2010) Alterations of NMDA receptor subunits NR1, NR2A and NR2B mRNA expression and their relationship to apoptosis following transient forebrain ischemia, *Brain Res.*, **1361**, 133-139, doi: 10.1016/j.brainres.2010.09.035.
  28. Zhou, J. J., Luo, Y., Chen, S. R., Shao, J. Y., Sah, R., and Pan, H. L. (2020) LRRC8A-dependent volume-regulated anion channels contribute to ischemia-induced brain injury and glutamatergic input to hippocampal neurons, *Exp. Neurol.*, **332**, 113391, doi: 10.1016/j.expneurol.2020.113391.
  29. Cordeiro, J. L., Neves, J. D., Vizuete, A. F., Aristimunha, D., Pedrosa, T. A., et al. (2020) Arundic Acid (ONO-2506), an inhibitor of S100B protein synthesis, prevents neurological deficits and brain tissue damage following intracerebral hemorrhage in male Wistar rats, *Neuroscience*, **440**, 97-112, doi: 10.1016/j.neuroscience.2020.05.030.
  30. Cui, G., Wang, Y., Yu, S., Yang, L., Li, B., et al. (2014) The expression changes of vacuolar protein sorting 4B (VPS4B) following middle cerebral artery occlusion (MCAO) in adult rats brain hippocampus, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **34**, 83-94, doi: 10.1007/s10571-013-9989-5.
  31. Kumar, V. (2019) Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation, *J. Neuroimmunol.*, **332**, 16-30, doi: 10.1016/j.jneuroim.2019.03.012.
  32. Bowyer, J. F., Sarkar, S., Burks, S. M., Hess, J. N., Tolani, S., et al. (2020) Microglial activation and responses to vasculature that result from an acute LPS exposure, *Neurotoxicology*, **77**, 181-192, doi: 10.1016/j.neuro.2020.01.014.
  33. Jayaraj, R. L., Azimullah, S., Beiram, R., Jalal, F. Y., and Rosenberg, G. A. (2019) Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke, *J. Neuroinflammation*, **16**, 142, doi: 10.1186/s12974-019-1516-2.
  34. Jiang, M. Q., Zhao, Y. Y., Cao, W., Wei, Z. Z., Gu, X., et al. (2017) Long-term survival and regeneration of neuronal and vasculature cells inside the core region after ischemic stroke in adult mice, *Brain Pathol.*, **27**, 480-498, doi: 10.1111/bpa.12425.
  35. Nakamura, Y., Kimura, S., Takada, N., Takemura, M., Iwamoto, M., et al. (2020) Stimulation of toll-like receptor 4 downregulates the expression of  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptors via histone deacetylase in rodent microglia, *Neurochem. Int.*, **138**, 104751, doi: 10.1016/j.neuint.2020.104751.
  36. Xu, H., Qin, W., Hu, X., Mu, S., Zhu, J., et al. (2018) Lentivirus-mediated overexpression of OTULIN ameliorates microglia activation and neuroinflammation by depressing the activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway in cerebral ischemia/reperfusion rats, *J. Neuroinflammation*, **15**, 83, doi: 10.1186/s12974-018-1117-5.
  37. Xia, C. Y., Zhang, S., Gao, Y., Wang, Z. Z., and Chen, N. H. (2015) Selective modulation of microglia polarization to M2 phenotype for stroke treatment, *Int. Immunopharmacol.*, **25**, 377-382, doi: 10.1016/j.intimp.2015.02.019.
  38. Liu, X., Wang, Q., Cui, Y., Li, X., and Yang, H. (2020) In-depth transcriptomic and proteomic analyses of the hippocampus and cortex in a rat model after cerebral ischemic injury and repair by Shuxuetong (SXT) injection, *J. Ethnopharmacol.*, **249**, 112362, doi: 10.1016/j.jep.2019.112362.
  39. Newrzella, D., Pahlavan, P. S., Krüger, C., Boehm, C., Sorgenfrei, O., et al. (2007) The functional genome of CA1 and CA3 neurons under native conditions and in response to ischemia, *BMC Genomics*, **8**, 370, doi: 10.1186/1471-2164-8-370.

40. Zhang, X., Yuan, M., Yang, S., Chen, X., Wu, J., et al. (2020) Enriched environment improves post-stroke cognitive impairment and inhibits neuroinflammation and oxidative stress by activating Nrf2-ARE pathway, *Int. J. Neurosci.*, doi: 10.1080/00207454.2020.1797722.
41. Yang, W., Li, G., Cao, K., Ma, P., Guo, Y., et al. (2020) Exogenous insulin-like growth factor 1 attenuates acute ischemic stroke-induced spatial memory impairment via modulating inflammatory response and tau phosphorylation, *Neuropeptides*, **83**, 102082, doi: 10.1016/j.npep.2020.102082.
42. Kawano, T., Morikawa, A., Imori, S., Waki, S., Tamura, T., et al. (2014) Preventive effects of multisensory rehabilitation on development of cognitive dysfunction following systemic inflammation in aged rats, *J. Anesth.*, **28**, 780-784, doi: 10.1007/s00540-013-1786-2.
43. Bossu, P., Cutuli, D., Palladino, I., Caporali, P., Angelucci, F., et al. (2012) A single intraperitoneal injection of endotoxin in rats induces long-lasting modifications in behavior and brain protein levels of TNF- $\alpha$  and IL-18, *J. Neuroinflamm.*, **9**, 101, doi: 10.1186/1742-2094-9-101.
44. Reichenberg, A., Yirmiya, R., Schuld, A., Kraus, T., Haack, M., et al. (2001) Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans, *Arch. Gen. Psychiatry*, **58**, 445-452, doi: 10.1001/archpsyc.58.5.445.
45. Schiepers, O. J., Wichers, M. C., and Maes, M. (2005) Cytokines and major depression, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **29**, 201-217, doi: 10.1016/j.pnpbp.2004.11.003.
46. Rukavishnikov, G. V., Kibitov, A. O., Mazo, G. E., and Neznanov, N. G. (2019) Genetic determinism of comorbidity of depression and somatic diseases, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **119**, 89-96, doi: 10.17116/jnevro201911901189.
47. Dantzer, R., O'Connor, J. C., Freund, G. G., Johnson, R. W., and Kelley, K. W. (2008) From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain, *Nat. Rev. Neurosci.*, **9**, 46-56, doi: 10.1038/nrn2297.
48. Shishkina, G. T., Bannova, A. V., Komysheva, N. P., and Dygalo, N. N. (2019) Doxycycline attenuates anxiety and microglia activation induced by repeated lipopolysaccharide, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **29**, S179-S180, doi: 10.1016/j.euroneuro.2019.09.276.
49. Shishkina, G. T., Bannova, A. V., Komysheva, N. P., and Dygalo, N. N. (2020) Anxiogenic-like effect of chronic lipopolysaccharide is associated with increased expression of matrix metalloproteinase 9 in the rat amygdala, *Stress*, **23**, 708-714, doi: 10.1080/10253890.2020.1793943.
50. Guan, X. T., Lin, W. J., and Tang, M. M. (2015) Comparison of stress-induced and LPS-induced depressive-like behaviors and the alterations of central proinflammatory cytokines mRNA in rats, *Psych. J.*, **4**, 113-122, doi: 10.1002/pchj.87.
51. Li, M., Li, C., Yu, H., Cai, X., Shen, X., et al. (2017) Lentivirus-mediated interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) knock-down in the hippocampus alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced memory deficits and anxiety- and depression-like behaviors in mice, *J. Neuroinflammation*, **14**, 190, doi: 10.1186/s12974-017-0964-9.
52. Camargos, Q. M., Silva, B. C., Silva, D. G., Toscano, E. C. B., Oliveira, B. D. S., et al. (2020) Minocycline treatment prevents depression and anxiety-like behaviors and promotes neuroprotection after experimental ischemic stroke, *Brain Res. Bull.*, **155**, 1-10, doi: 10.1016/j.brainresbull.2019.11.009.
53. He, L., He, R., Liang, R., Li, Y., Li, X., et al. (2018) Protein expression profiling in the hippocampus after focal cerebral ischemia injury in rats, *J. Integr. Neurosci.*, **17**, 149-158, doi: 10.31083/JIN-170047.
54. Radenovic, L., Nenadic, M., Ułamek-Kozioł, M., Januszewski, S., Czuczwar, S. J., et al. (2020) Heterogeneity in brain distribution of activated microglia and astrocytes in a rat ischemic model of Alzheimer's disease after 2 years of survival, *Aging (Albany NY)*, **12**, 12251-12267, doi: 10.18632/aging.103411.
55. Pluta, R., Ułamek-Kozioł, M., Januszewski, S., and Czuczwar, S. J. (2020) Participation of amyloid and tau protein in neuronal death and neurodegeneration after brain ischemia, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 4599, doi: 10.3390/ijms21134599.
56. Xu, C. S., Liu, A. C., Chen, J., Pan, Z. Y., Wan, Q., et al. (2015) Overactivation of NR2B-containing NMDA receptors through entorhinal-hippocampal connection initiates accumulation of hyperphosphorylated tau in rat hippocampus after transient middle cerebral artery occlusion, *J. Neurochem.*, **134**, 566-577, doi: 10.1111/jnc.13134.
57. Goulay, R., Mena Romo, L., Hol, E. M., and Dijkhuizen, R. M. (2020) From stroke to dementia: a comprehensive review exposing tight interactions between stroke and amyloid- $\beta$  formation, *Transl. Stroke Res.*, **11**, 601-614, doi: 10.1007/s12975-019-00755-2.
58. Gemmell, E., Bosomworth, H., Allan, L., Hall, R., Khundakar, A., et al. (2012) Hippocampal neuronal atrophy and cognitive function in delayed poststroke and aging-related dementias, *Stroke*, **43**, 808-814, doi: 10.1161/STROKEAHA.111.636498.
59. Hagberg, G., Ihle-Hansen, H., Fure, B., Thommessen, B., Ihle-Hansen, H., et al. (2020) No evidence for amyloid pathology as a key mediator of neurodegeneration post-stroke – a seven-year follow-up study, *BMC Neurol.*, **20**, 174, doi: 10.1186/s12883-020-01753-w.
60. Hu, Y., Guo, T. C., Zhang, X. Y., Tian, J., and Lu, Y. S. (2019) Paired associative stimulation improves synaptic plasticity and functional outcomes after cerebral ischemia, *Neural. Regen. Res.*, **14**, 1968-1976, doi: 10.4103/1673-5374.259618.
61. Chen, C., Dong, Y., Liu, F., Gao, C., Ji, C., et al. (2020) A Study of antidepressant effect and mechanism on intranasal delivery of BDNF-HA2TAT/AAV to rats with post-stroke depression, *Neuropsychiatr. Dis. Treat.*, **16**, 637-649, doi: 10.2147/NDT.S227598.
62. Drapeau, E., Mayo, W., Arousseau, C., Le Moal, M., Piazza, P. V., and Abrous, D. N. (2003) Spatial memory performances of aged rats in the water maze predict levels of hippocampal neurogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 14385-14390, doi: 10.1073/pnas.2334169100.
63. Cuartero, M. I., de la Parra, J., Pérez-Ruiz, A., Bravo-Ferrant, I., Durán-Laforet, V., et al. (2019) Abolition of aberrant neurogenesis ameliorates cognitive impairment after stroke in mice, *J. Clin. Invest.*, **129**, 1536-1550, doi: 10.1172/JCI120412.
64. Arvidsson, A., Kokaia, Z., and Lindvall, O. (2001) N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke, *Eur. J. Neurosci.*, **14**, 10-18, doi: 10.1046/j.0953-816x.2001.01611.x.
65. Bielefeld, P., Dura, I., Danielewicz, J., Lucassen, P. J., Baekelandt, V., et al. (2019) Insult-induced aberrant hippocampal neurogenesis: Functional consequences and possible therapeutic strategies, *Behav. Brain Res.*, **372**, 112032, doi: 10.1016/j.bbr.2019.112032.
66. Faiz, M., Sachewsky, N., Gascon, S., Bang, K. W., Morshead, C. M., and Nagy, A. (2015) Adult neural stem cells from the subventricular zone give rise to reactive astrocytes in the cortex after stroke, *Cell Stem Cell*, **17**, 624-634, doi: 10.1016/j.stem.2015.08.002.
67. O'Connor, J. C., Lawson, M. A., André, C., Moreau, M., Lestage, J., et al. (2009) Lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior is mediated by indoleamine 2,3-

- dioxygenase activation in mice, *Mol. Psychiatry*, **14**, 511-522, doi: 10.1038/sj.mp.4002148.
68. Shishkina, G. T., Kalinina, T. S., and Dygalo, N. N. (2007) Up-regulation of tryptophan hydroxylase-2 mRNA in the rat brain by chronic fluoxetine treatment correlates with its antidepressant effect, *Neuroscience*, **150**, 404-412, doi: 10.1016/j.neuroscience.2007.09.017.
  69. Cowen, P. J., and Browning, M. (2015) What has serotonin to do with depression? *World Psychiatry*, **14**, 158-160, doi: 10.1002/wps.20229.
  70. Shilov, Yu. E., and Bezrukov, M. V. (2013) Kinurenins in the pathogenesis of endogenous mental diseases, *Vestn. Ross. Akad. Med. Nauk*, **68**, 35-41, doi: 10.15690/vramn.v68i1.535.
  71. Tavares, R. G., Tasca, C. I., Santos, C. E., Alves, L. B., Porciúncula, L. O., et al. (2002) Quinolinic acid stimulates synaptosomal glutamate release and inhibits glutamate uptake into astrocytes, *Neurochem. Int.*, **40**, 621-627, doi: 10.1016/s0197-0186(01)00133-4.
  72. Francija, E., Petrovic, Z., Brkic, Z., Mitic, M., Radulovic, J., Adzic, M. (2019) Disruption of the NMDA receptor GluN2A subunit abolishes inflammation-induced depression, *Behav. Brain Res.*, **359**, 550-559, doi: 10.1016/j.bbr.2018.10.011.
  73. Koo, Y. S., Kim, H., Park, J. H., Kim, M. J., Shin, Y. I., et al. (2018) Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent neurotoxic kynurenine metabolism contributes to post-stroke depression induced in mice by ischemic stroke along with spatial restraint stress, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2018**, 2413841, doi: 10.1155/2018/2413841.
  74. Li, Z. G., Shui, S. F., Han, X. W., and Yan, L. (2020) NLRP10 ablation protects against ischemia/reperfusion-associated brain injury by suppression of neuroinflammation, *Exp. Cell Res.*, **389**, 111912, doi: 10.1016/j.yexcr.2020.111912.
  75. Camara, M. L., Corrigan, F., Jaehne, E. J., Jawahar, M. C., Anscomb, H., and Baune, B. T. (2015) Effects of centrally administered etanercept on behavior, microglia, and astrocytes in mice following a peripheral immune challenge, *Neuropsychopharmacology*, **40**, 502-512, doi: 10.1038/npp.2014.199.
  76. Avdic, U., Ahl, M., Oberg, M., and Ekdahl, C. T. (2019) Immune profile in blood following non-convulsive epileptic seizures in rats, *Front. Neurol.*, **10**, 701, doi: 10.3389/fneur.2019.00701.
  77. Vieira, M., and Saraiva, M. J. (2014) Transthyretin: a multifaceted protein, *Biomol. Concepts*, **5**, 45-54, doi: 10.1515/bmc-2013-0038.
  78. Sharma, M., Khan, S., Rahman, S., and Singh, L. R. (2019) The extracellular protein, transthyretin is an oxidative stress biomarker, *Front. Physiol.*, **10**, 5, doi: 10.3389/fphys.2019.00005.
  79. Ming, Z., Sawicki, G., and Bekar, L. K. (2015) Acute systemic LPS-mediated inflammation induces lasting changes in mouse cortical neuromodulation and behavior, *Neurosci. Lett.*, **590**, 96-100, doi: 10.1016/j.neulet.2015.01.081.

## CHANGES IN GENE EXPRESSION AND NEUROINFLAMMATION IN THE HIPPOCAMPUS AFTER FOCAL BRAIN ISCHEMIA: PARTICIPATION IN THE LONG-TERM COGNITIVE AND PSYCHOLOGICAL DISTURBANCES

### Review

**G. T. Shishkina<sup>1\*</sup>, T. S. Kalinina<sup>1</sup>, N. V. Gulyaeva<sup>2</sup>, D. A. Lanshakov<sup>1</sup>, and N. N. Dygalo<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *The Federal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: gtshi@bionet.nsc.ru*

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

Ischemic brain injuries are accompanied by the long-term changes in gene expression in the hippocampus, the limbic system structure, involved in the regulation of key aspects of the higher nervous activity, such as cognitive functions and emotions. The altered expression of genes and proteins encoded by them may be related to the development of post-ischemic psycho-emotional and cognitive disturbances. Activation of neuroinflammation following stroke in the hippocampus has been suggested to play an essential role in induction of long-lasting consequences. Identification of changes in the gene expression patterns after ischemia and investigation of the dynamics of these changes in the hippocampus are the necessary first steps toward understanding molecular pathways responsible for the development of post-stroke cognitive impairments and mental pathologies.

**Keywords:** focal brain injuries, neuroinflammation, hippocampus, gene expression, cognitive impairment, depression

## МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

### Обзор

© 2021 В.С. Сухоруков<sup>1</sup>, Н.М. Муджири<sup>1\*</sup>, А.С. Воронкова<sup>1</sup>,  
Т.И. Баранич<sup>1,2</sup>, В.В. Глинкина<sup>2</sup>, С.Н. Иллариошкин<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ Научный центр неврологии, 125367 Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 117997 Москва, Россия;  
электронная почта: mudzhirinm@gmail.com

Поступила в редакцию 15.02.2021

После доработки 15.02.2021

Принята к публикации 23.03.2021

Болезнь Альцгеймера – это самое распространенное нейродегенеративное заболевание пожилого возраста. Представления об этиологии и патогенезе болезни Альцгеймера постоянно расширяются. Так, все больше внимания исследователей направлено на изучение роли митохондриальных нарушений. Кроме того, в последние годы активно продолжает формироваться представление о болезни Альцгеймера как о стресс-индуцированном заболевании. Индуцированные стрессом повреждения нервной системы могут запускать порочный круг патологических процессов, среди которых значимое место занимает дисфункция митохондрий, важного звена антистрессорной активности клетки. Изучение митохондриальных нарушений при болезни Альцгеймера актуально, по крайней мере, по двум основаниям: во-первых, как важного патогенетического звена этого заболевания; во-вторых, с учетом роли митохондрий в формировании устойчивости организма к различным, в том числе стрессорным воздействиям в течение жизни. В представленном обзоре литературы проанализированы результаты ряда недавних исследований, посвященных оценке потенциальной значимости митохондриальных нарушений при болезни Альцгеймера. Рассмотрены вероятные механизмы митохондриальных нарушений, ассоциированных с развитием этого заболевания: биоэнергетические дисфункции, изменения митохондриальной ДНК (включая оценку значимости особенностей гаплогрупп), нарушения динамики этих органелл, окислительные повреждения кальциевых каналов, повреждения мембран, ассоциированных с митохондриями, нарушения системы митохондриального контроля качества, митохондриальной проницаемости и др. Обсуждены вопросы о «первичности» или «вторичности» митохондриального поражения при болезни Альцгеймера. Рассмотрены перспективы разработки новых методов диагностики и терапии митохондриальных нарушений при болезни Альцгеймера.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** болезнь Альцгеймера, стресс-индуцированные заболевания, митохондрии, митохондриальные нарушения.

DOI: 10.31857/S0320972521060051

### ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера – это самое распространенное нейродегенеративное заболевание пожилого возраста. В основе его патогенеза лежит прогрессирующая потеря нейронов в коре больших полушарий головного мозга и гиппокампе с накоплением амилоидных бляшек и внутриклеточных нейрофибриллярных клубков. Наиболее значимым среди белков, депонированных в бляшках, является  $\beta$ -амилоид (A $\beta$ ), который продуцируется за счет расщепления белка-предшественника амилоида (APP) с помощью пресенилина-1 (PS1) и/или пресенилина-2 (PS2); последние представляют собой активные компо-

ненты комплекса  $\gamma$ -секретазы. Примечательно, что доминантно наследуемые мутации как в пресенилинах, так и в APP, в настоящее время являются единственными известными причинами семейной формы болезни Альцгеймера (FAD), что привело к наиболее распространенной гипотезе, объясняющей патогенез болезни Альцгеймера, а именно «амилоидный каскад», предполагающей, что отложение  $\beta$ -амилоида в мозге является основным патологическим триггером заболевания [1]. Тем не менее, хотя гипотеза амилоидного каскада помогает объяснить развитие бляшек и, возможно, клубков, она мало учитывает другие аспекты заболевания. В числе последних – изменение метаболизма фосфолипидов и жирных кислот, повышенный уровень циркулирующего холестерина, отложение внут-

\* Адресат для корреспонденции.



риклеточных липидных включений, изменение уровня глюкозы, нарушение гомеостаза кальция, стресс эндоплазматического ретикулума и, наконец, дисфункция митохондрий [2].

В последние годы все активнее продолжает формироваться представление о болезни Альцгеймера как о стресс-индуцированном заболевании. Хронические или часто повторяющиеся нейроэндокринные и поведенческие изменения при стрессе являются фактором нарушения ключевых процессов метаболизма, пластичности и выживаемости нейронов. В свою очередь, эти индуцированные стрессом повреждения нервной системы могут запускать каскад патологических процессов, приводя к развитию гипертонии, атеросклероза, инсулинорезистентности и других периферических нарушений, которые, в свою очередь, косвенно способствуют невропатологическим процессам, участвующим в развитии и прогрессировании болезни Альцгеймера [3, 4]. Показано, что повышенный психосоциальный стресс в течение жизни, в том числе в раннем возрасте, является фактором риска наиболее частой формы этого заболевания, а именно мультифакторной болезни Альцгеймера с поздним дебютом [5, 6]. При этом стресс в раннем возрасте опосредуется, вероятно, эпигенетическими факторами, такими как метилирование ДНК [7]. В связи с вышесказанным актуальность изучения эффектов, связанных со стрессом и антистрессорными реакциями, становится абсолютно очевидна, в частности для разработки новых подходов к лечению болезни Альцгеймера.

На протяжении ряда лет активно обсуждается роль митохондриальных нарушений в развитии нейродегенеративных заболеваний [8–18]. Идут активные споры о том, являются ли эти дисфункции причиной, следствием или побочным эффектом основных патогенетических изменений нервной ткани.

Помимо общеизвестного участия в энергообмене митохондрии участвуют в регуляции и других важнейших функций: синтез пиримидинов и пуринов, образование стероидов, синтез гема, регулирование азотистого баланса через цикл мочевины, выработка кетоновых тел, обработка ксенобиотиков, окислительно-восстановительная балансировка, участие в противовирусной защите, регулирование апоптоза и др. [19]. Как вполне обоснованно указывают исследователи из университета Сапиенца в Риме [20], с учетом перечисленного становится понятной высокая чувствительность митохондрий ко многим молекулярным нарушениям, а также, с другой стороны, обширность списка клеточных последствий повреждения самих этих органелл.

В контексте представленной статьи следует подчеркнуть, что изучение митохондриальных нарушений при болезни Альцгеймера актуально по нескольким основаниям, в частности с учетом роли митохондрий как важного патогенетического звена, а также индивидуальных особенностей тканевой биоэнергетики, когда митохондриальный статус определяет устойчивость организма к различным, в том числе стрессорным воздействиям в течение жизни [21–23]. Митохондрии являются значимыми посредниками стрессовых сигналов, поступающих в клетку. В ответ на стресс митохондрии могут регулировать клеточный цикл, межклеточные взаимодействия – и в критической ситуации запускать апоптоз [24]. Большинство известных стресс-индуцированных молекулярных каскадов так или иначе включают в себя митохондриальные белки. Так, к примеру Nrf2, ключевой регулятор клеточного антистрессового ответа, ассоциирован с митохондриальной мембраной через комплекс белков KEAP1–PGAM5. Хронически повышенный уровень экспрессии Nrf2 в ответ на стрессовые сигналы снижает подвижность митохондрий. Как следствие, нарушаются трофические процессы в нервной ткани и нейропластичность, что напрямую связано с нейродегенеративными процессами [25]. В экспериментах на дрозофилах было показано, что умеренная активация Nrf2 увеличивала продолжительность жизни, однако поддержание гиперактивации Nrf2 в течение длительного времени приводило к летальности на стадии личинок и резко снижало продолжительность жизни у взрослых мух. Дальнейшие исследования продемонстрировали, что хроническая гиперактивация Nrf2 репрограммировала биоэнергетику клеток и приводила к появлению диабетического фенотипа. Данный фенотип вызван Nrf2-опосредованной супрессией сигналинга Ins/IGF (инсулин/IGF-like). Длительная гиперактивация Nrf2 также подавляла экспрессию генов, кодирующих регуляторы сна и циркадных ритмов, а также белки, играющие роли в поведенческих реакциях ухаживания, спаривания и размножения. Полученные данные выстраивают картину реакции на стресс, где даже в отсутствие каких-либо повреждений хронически активируемые стрессовые сигнальные пути запускают адаптивный метаболический ответ, который перераспределяет клеточные ресурсы от поддержания большой продолжительности жизни к соматической стрессоустойчивости. Тем не менее известные побочные эффекты, вызванные длительной гиперактивацией Nrf2, не должны останавливать поиск возможных терапевтических мишеней в Nrf2-сигнальном пути. В данном ключе

особенно важным становится определение дозы, длительности приема, тканевой направленности препаратов-активаторов таких сенсоров стресса, как Nrf2, а также изучение взаимодействий этих сенсоров с сигнальными путями, вовлеченными в патогенез различных заболеваний [26, 27]. Особый интерес представляют также данные о том, что в ответ на стресс сигнальный путь Keap1/Nrf2 посредством Nrf2, помимо прочего, повышает экспрессию генов протеасом, а увеличение протеасомной активности, в свою очередь, приводит к деградации белка Drp1, который является важным регулятором фрагментации митохондрий [28].

В последние годы доказательства многообразия митохондриальных повреждений при болезни Альцгеймера становятся все более многочисленными [29]. Среди них – свидетельства об активном проникновении  $\beta$ -амилоида в митохондрии и связывании его с митохондриальными белками, об активной генерации свободных радикалов, о нарушении взаимосвязи митохондрий с другими внутриклеточными структурами и их патологической фрагментации. Повреждение митохондрий в клетках нервной ткани может быть критично до степени, приводящей к гибели клетки.

Связь между митохондриальной дисфункцией и патогенезом болезни Альцгеймера предполагалась давно в нескольких работах [30–32].

Одни из первых доказательств роли нарушения энергетического метаболизма мозга в патогенезе этого заболевания (как и в некоторых других вариантах деменции) были получены в 1987 г. [33]. Авторы исследовали поглощение кислорода в гомогенатах свежих образцов лобной коры у пациентов с деменцией. Максимальный уровень дыхания (измеренный в присутствии разобщающего агента) был одинаков во всех случаях, что позволило авторам предположить, что исследованные формы слабоумия практически не влияют на максимальную метаболическую емкость нервной ткани. При этом показатели поглощения кислорода были значительно повышены при деменции на имеющем значительно большее физиологическое значение субмаксимальном уровне. Кроме того, отношение уровней поглощения кислорода в присутствии и в отсутствие ADP было значительно снижено (до 58% от контроля;  $p < 0,02$ ) у пациентов с деменцией, что может свидетельствовать в пользу частичной разобщенности митохондрий. Авторы высказали предположение о выявлении ими метаболических изменений, которые могут иметь отношение к патогенезу нейродегенеративных заболеваний, в частности к болезни Альцгеймера.

Прямые доказательства связи между митохондриальной дисфункцией и патогенезом болезни Альцгеймера стали появляться с начала 1990-х гг. В ряде работ было обнаружено снижение активности IV комплекса дыхательной цепи у больных как в тромбоцитах при жизни, так и в мозге после смерти. Кроме того, в различных участках коры (однако не в тромбоцитах) было снижено содержание соответствующих белков и РНК [34–37]. Особенно это касалось тех субъединиц цитохром с-оксидазы, которые кодируются мтДНК [38].

Ниже рассмотрим некоторые сложившиеся к настоящему времени представления об особенностях митохондриального повреждения при болезни Альцгеймера более подробно.

### ВЕРОЯТНЫЕ МЕХАНИЗМЫ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Как при семейных, так и при спорадических формах болезни Альцгеймера в первую очередь страдает биоэнергетическая функция – работа дыхательной цепи и синтез АТФ [13, 33, 39, 40]. Имеются также указания на нарушение работы цикла Кребса [31, 41]. Внутриклеточное содержание свободных радикалов и активных форм кислорода при болезни Альцгеймера повышено [39, 42, 43].

Среди других митохондриальных нарушений при болезни Альцгеймера наблюдаются аномалии внутриклеточного распределения митохондрий при аксональном транспорте [44]; появление перинуклеарных скоплений с образованием вокруг ядра своеобразных колец из этих органелл [2, 45]; нарушение динамики деления (fission) и слияния (fusion) митохондрий [42, 46].

**Биоэнергетические нарушения.** Вслед уже процитированным ранним исследованиям 80-90-х гг. прошлого века стали появляться новые доказательства патогенетической значимости биоэнергетических нарушений при болезни Альцгеймера.

Так, авторы из университета Базеля [47] оценили параметры состояния митохондрий в двух клеточных моделях болезни Альцгеймера: клетках с гиперэкспрессией  $\beta$ -амилоида и с гиперэкспрессией тау-белка. Для сравнения использовали клетки нейробластомы человека. Такие параметры, как выработка АТФ и потенциал митохондриальной мембраны, были изучены в базальном состоянии и после стимуляции стресса эндоплазматического ретикулума (ЭР). В обеих моделях болезни Альцгеймера было зарегистрировано снижение биоэнергетического потенци-

ала митохондрий, а также активация экспрессии генов UPR (unfolded protein response) по сравнению с контролем. При стрессе ЭР уровень экспрессии генов UPR еще более повышался, приводя к дальнейшим повреждениям митохондрий и активации апоптоза.

Изучение мозга при болезни Альцгеймера позволило выявить специфические нарушения таких значимых молекул, как АТФ-синтаза, марганцевая супероксиддисмутаза (MnSOD), малатдегидрогеназа и потенциал-зависимые анионные каналы (VDAC), так и некоторых звеньев гликолиза (Eno1). Кроме того, доклинические эксперименты на модели болезни Альцгеймера *in vitro* и *in vivo* показывают, что дефицит митохондриальной функции, экспрессии и активности метаболических ферментов, метаболизма глюкозы и поглощения свободных радикалов в мозге связаны с митохондриальной нагрузкой  $\beta$ -амилоидом и уровнем экспрессии  $\beta$ -амилоид-связывающей алкогольдегидрогеназы (ABAD) [20, 48].

Значительные нарушения митохондриальных функций и клеточного энергообмена обнаружены при исследовании протеома синапсом на амилоидогенной модели болезни Альцгеймера у мышей линии APP/PS1 [49]. Согласно предположению авторов, митохондриальный окислительный стресс связан с накоплением меток фактора комплемента C1q на синаптической поверхности, что является триггером комплемент-зависимой потери синапсов при болезни Альцгеймера. Авторами также высказано предположение, что связанные с синаптической потерей изменения в спектре септинов (ключевых в этом процессе белков) могут объясняться нарушением роли митохондрий в организации этих белков.

#### **Изменения митохондриальной ДНК при болезни Альцгеймера.**

1. Гаплогрупповые особенности, вызванные повышенной частотой встречаемости некоторых полиморфных вариантов мтДНК у различных групп населения [50, 51];

2. Делеции [52];

3. Точечные мутации [53];

4. Снижение уровня мтДНК (в частности, в цереброспинальной жидкости) [54];

5. Повышение уровня экспрессии субъединиц дыхательной цепи, кодируемых мтДНК, на фоне снижения экспрессии субъединиц дыхательной цепи, кодируемых ядерной ДНК [55].

Однако в связи с противоречивостью имеющихся данных, лишь небольшое число вариантов можно расценивать как ассоциированные с болезнью Альцгеймера, тем более доказательств материнского наследования этого заболевания очень мало [2, 56]. В дополнение можно приве-

сти данные авторов из Вашингтонского Университета в Сент-Луисе [57], где перечислены более двадцати ядерных генов, полиморфизмы в которых могут привести к повышенному риску болезни Альцгеймера (в том числе ее спорадических форм); при этом ни один из белковых продуктов этих генов не связан напрямую с деятельностью митохондрий.

**Значение гаплогрупповых особенностей митохондриальной ДНК.** Данные о клинической значимости индивидуальных гаплогрупповых различий мтДНК все активнее обсуждаются в научной литературе, при этом растет число фактов, указывающих на связь этих особенностей митохондриального генома с индивидуальным риском нейродегенеративных заболеваний [18, 53, 58, 59], в том числе и болезни Альцгеймера [60]. Первые доказательства этому получили Wallace et al. в 1993 г. – частота мутации A4336G в гене глициновой тРНК была выявлена у 3,2% пациентов с болезнью Альцгеймера, в 5,3% случаев болезни Паркинсона и в 6,8% сочетанных случаев этих двух заболеваний; при этом частота мутации в контроле составляла лишь 0,4% [61]. Этот полиморфный вариант получил название H5a; он относится к наиболее распространенной среди европейского населения гаплогруппе H [62]. В ряде работ впоследствии были получены новые доказательства связи этого и некоторых других полиморфных вариантов мтДНК у европеоидов с повышенным риском нейродегенерации [53, 63].

У представителей крупнейшей китайской народности Хань также были изучены гаплогрупповые особенности мтДНК: в состав исследования вошел 341 пациент с болезнью Альцгеймера и 435 человек в качестве контрольной группы. Гаплогруппа B5 значительно чаще встречалась в группе пациентов (7,33% против 3,68% в контроле), что в совокупности с другими данными свидетельствует в пользу вероятной связи этой гаплогруппы с повышенным риском болезни Альцгеймера ( $p = 0,02$ ) [60].

Важные результаты были получены в экспериментах на цитоплазматических гибридах («цибридах»), являющихся незаменимым инструментом митохондриальной биоинженерии. Для их получения ядро клетки-донора помещают в цитоплазму клетки-реципиента с удаленным ядром, содержащую митохондрии с определенными нарушениями. Последующее изучение цибридов позволяет оценить специфическое влияние митохондриальных дефектов на метаболизм клетки, экспрессию ядерного генома и т.д. При создании цибридов из здоровых клеток и митохондрий пациентов с болезнью Альцгеймера в здоровых клетках развивался био-

химический, молекулярный и гистологический фенотип, характерный для клеток-реципиентов [64]. Эти данные послужили подтверждением гипотезы митохондриального каскада.

**Гипотеза митохондриального каскада.** Эта гипотеза, первоначально предложенная Swerdlow and Khan (2004) [14] в качестве объяснения болезни Альцгеймера с поздним началом (LOAD), предполагала, что наследственные и накопленные в результате старения генетические варианты мтДНК являются вершиной каскада болезни Альцгеймера. Упомянутые изменения приводят к недостаточной функции цепи переноса электронов, что, в свою очередь, приводит к снижению продукции АТФ, увеличению продукции свободных радикалов, нарушению гомеостаза кальция. Возникает порочный круг, связанный с дальнейшим повреждением мтДНК, РНК, белков и липидов. При достижении определенного порога во внутренней митохондриальной мембране располагается активируемый кальцием белок mPTP (mitochondrial permeability transition pore), образующий огромные поры и приводящий к гибели органелл (митоптоз) и всей клетки (апоптоз). Нервная система стала одной из первых, где были описаны механизмы действия белка mPTP. Было показано, что это приводит к продукции  $\beta$ -амилоида и отложению бляшек, а также к гиперфосфорилированию тау-белка и образованию нейрофибриллярных клубков. Очевидно, не менее значимы в патогенезе болезни Альцгеймера и повреждения митохондрий, связанные с дефектами их взаимодействия с эндоплазматическим ретикуломом и нарушением митохондриальной динамики [65].

Несмотря на то что при болезни Альцгеймера явно происходят нарушения деятельности митохондрий, гипотеза митохондриального каскада имеет ряд недостатков, и будучи ранним звеном патогенеза этого заболевания, митохондриальная дисфункция, вероятнее всего, не является его ведущей движущей силой [2].

**Фрагментация митохондрий.** Одним из наиболее ярких митохондриальных нарушений при ряде нейродегенеративных заболеваний, в том числе при болезни Альцгеймера, является нарушение динамики митохондриального биогенеза, а именно баланса процессов слияния (fusion) и деления (fission) органелл. При нейродегенерации в клетках нервной ткани, очевидно, происходит смещение баланса в сторону деления, что реализуется в форме избыточного расщепления (патологической фрагментации) митохондрий. Деление митохондрий опосредуется белком Drp1 (dynamin-related protein 1), который является GTPазой, рекрутируемой к наружной митохондриальной мембране из цитозоля не-

сколькими белками, включая Fis1 (fission 1), Mff (mitochondrial fission factor), MiD 49/51 (mitochondrial dynamics proteins 49/51).

Группа ученых под руководством Стюарта Липтона из Института медицинских исследований Бернхэма [66] при изучении культур нейронов пришла к предположению, что в основе нейродегенерации при болезни Альцгеймера может лежать S-нитрозилирование белка Drp1, вызываемое свободным радикалом оксида азота. Продукт этой реакции (S-nitrosylated Drp1, SNO-Drp1) инициирует фрагментацию митохондрий в области нейрональных синапсов и последующую нейродегенерацию. По мнению авторов, именно этот механизм лежит в основе патогенеза болезни Альцгеймера, т.к. именно  $\beta$ -амилоид генерирует в нейронах оксид азота. Таким образом, белок Drp1 (и в равной степени его модификация SNO-Drp1) может использоваться в качестве биомаркера при разработке таргетного лечения болезни Альцгеймера. Для подтверждения своей гипотезы исследователи инактивировали белок Drp1 различными способами: результатом было снижение уровня митохондриальной фрагментации с предотвращением повреждения синапсов и последующей нейродегенерации. В частности, такой эффект наблюдается при замене указанного белка на его мутантную форму, у которой отсутствует сайт нитрозилирования.

Позднее стало известно, что в нейронах различных линий, инкубируемых в присутствии  $\beta$ -амилоида, а также в фибробластах пациентов, страдающих семейной формой болезни Альцгеймера, значительно активируется взаимодействие белков Fis1 и Drp1. Исследователи из Стэнфордского университета получили доказательства [67], что подавление активности указанного взаимодействия может быть использовано при разработке новых подходов к терапии заболевания. С этой целью ими был использован короткий пептид P110, который избирательно ингибирует связывание Drp1 с митохондриями. Его добавление к вышеуказанным клеточным культурам приводило к нормализации митохондриального биогенеза и активности во всех типах клеток.

**Оксидативное повреждение кальциевых каналов RyR2.** Группа ученых из Сантьяго изучила действие антиоксиданта N-ацетилцистеина в нейронах гиппокампа при моделировании болезни Альцгеймера у крыс [68]. В основе модели лежит синаптотоксическое действие олигомеров  $\beta$ -амилоида, вызывающее в этих клетках нарушение кальциевых сигналов и синаптической пластичности, а также митохондриальную дисфункцию. Очевидно, во многом это обусловлено снижением количества рианодинных рецеп-

торов второго типа (RyR2) – кальциевых каналов, играющих важную роль в синаптической пластичности нейронов гиппокампа и поддержании процессов пространственной памяти. Ранее эти авторы показали, что N-ацетилцистеин *in vitro* защищает нейроны от такого повреждения. В цитируемой работе соответствующие процессы исследованы *in vivo*: олигомеры  $\beta$ -амилоида вводились непосредственно в гиппокамп крыс. Эти инъекции значительно снижали содержание белка RyR2 (активируя при этом оставшиеся единичные каналы), снижали уровень глутатиона в гиппокампе и общее содержание других белков, связанных с пластичностью (c-Fos, Arc), а также повышали уровень фосфорилирования ERK1/2. Последнее приводит к активации киназы GSK-3, фосфорилированию тау-белка и APP и, в конечном итоге, к амилоидогенному протеолизу APP и дальнейшей генерации  $\beta$ -амилоида [69]. В результате было зафиксировано значительное нарушение пространственной памяти у подопытных животных. При этом предварительное трехнедельное пероральное введение крысам N-ацетилцистеина полностью предотвращало указанные изменения. Авторы предположили, что полученные результаты являются дополнительным доказательством патогенетической роли оксидативного повреждения кальциевых каналов RyR2 в развитии нарушений памяти у лабораторных животных. Это первое сообщение, описывающее ингибирующее действие  $\beta$ -амилоида на содержание белка RyR2 у крыс дикого типа *in vivo*. Предыдущие исследования роли RyR2 в патогенезе болезни Альцгеймера были выполнены на трансгенных моделях, которые, помимо изменений в продукции  $\beta$ -амилоида, также демонстрировали изменения в пресенилинах или тау-белках. При такой модели было невозможно установить специфичность изменений экспрессии и функций RyR2 в ответ на накопление этого патологического пептидного комплекса.

**Нарушения комплекса МАМ.** Для поддержания клеточного гомеостаза между ЭПР и митохондриями происходит непрерывный обмен сигнальными молекулами. Эта коммуникация осуществляется за счет физического контакта между органеллами. С помощью электронной микроскопии удалось установить, что таким образом органеллы формируют специфический микродомен, получивший название МАМ (мембраны, ассоциированные с митохондриями; mitochondria-associated membranes) [70]. Комплекс МАМ служит платформой для анализа жизненно важных сигналов, а также участвует в организации ряда каркасных белков и регуляторных факторов [71].

Одной из причин повышенного внимания к комплексу МАМ явился быстрый рост числа докладов о серьезных нарушениях при нейродегенеративных заболеваниях, в том числе при болезни Альцгеймера. На экспериментальных моделях болезни показано, что на самых ранних стадиях в коре головного мозга отмечается целый комплекс изменений в белках МАМ; эти изменения достоверно коррелируют с динамикой накопления  $\beta$ -амилоида и клиническими проявлениями заболевания [72]. Как известно, наследственный вариант болезни Альцгеймера может быть связан с кальциевой перегрузкой клеток, ключевой причиной которой является гиперэкспрессия белка пресенилина PS2, способствующего транспортировке кальция из саркоплазматического ретикула в митохондрии [73]. Стоит отметить, что пресенилины PS1 и PS2, являясь универсальными клеточными белками, вовлечены в систему МАМ и комплекс  $\gamma$ -секретазы, обеспечивающей синтез  $\beta$ -амилоидных белков [74]. Однако из двух видов пресенилинов только PS2 способствует физическому и функциональному взаимодействию митохондрий и ЭПР. Согласно недавним исследованиям, PS2 увеличивает число контактирующих сайтов между ЭПР и митохондрией, которые затем закрепляются митофузином [75]. Вовлеченность МАМ в патогенез болезни Альцгеймера была подтверждена исследованием на пресенилин-мутантных клеточных культурах в сравнении со здоровыми клетками и клетками, полученными от пациентов с болезнью Альцгеймера. В мутантных клетках, как и в клетках пациентов, наблюдалась повышенная активность МАМ [76]. Она была подтверждена двумя показателями:

1) Повышенная экспрессия гена ACAT1 (ацил-КоА-холестерол-ацилтрансфераза, превращающая холестерол в эфиры холестерола). Уровень экспрессии данного гена положительно коррелирует со скоростью образования липидных гранул.

2) Синтез фосфолипидов по альтернативному пути, задействующему МАМ. В последнем происходит синтез фосфатидилсерина, который затем поступает в митохондрии, где конвертируется в этаноламин с помощью фосфатидилсериндекарбоксилазы. Фосфатидилсериндекарбоксилаза митохондрий выступала показателем интеграции между ЭПР и митохондриями в данном исследовании [77].

Таким образом, повышение уровня холестерола и усиление фосфолипидного метаболизма в мутантных клетках по сравнению с контрольными культурами указывали на повышение уровня взаимодействия ЭПР и митохондрий.

Исходя из этих данных, логично предположить, что уменьшение взаимодействия между двумя органеллами может снизить интенсивность патологических процессов, лежащих в основе болезни Альцгеймера. И действительно, при депляции митофузина-2 концентрации фосфолипидов и холестерина снижаются [78].

В уже цитированной работе чилийских ученых [68] заслуживает внимания фрагмент, посвященный изучению белковых фракций МАМ в материале гиппокампа после инъекции олигомеров  $\beta$ -амилоида. Авторы отметили значительное по сравнению с контролем увеличение содержания ряда составляющих комплекса МАМ в этих локальных фракциях, а именно белков IP3R1, VDAC, CNX и ACSL-4. Это наблюдение подтверждает более ранние работы о роли МАМ в болезни Альцгеймера [79]. Кроме того, в цитируемой работе впервые было продемонстрировано появление в составе гиппокампального МАМ значительного содержания RyR2 (в отличие от гиппокампа в целом). Было высказано предположение, что повышение RyR2 отражает компенсаторные изменения в МАМ, препятствующие кальциевой перегрузке митохондрий.

Механизм митохондриальной дисфункции как результат роли МАМ до сих пор не изучен. Также открыт вопрос касательно деятельности МАМ при спорадической форме болезни Альцгеймера, когда процессинг APP предположительно нормален.

**Нарушение «контроля качества митохондрий» и проницаемости митохондриальных пор.** Исследователи из Чехии в своей недавней работе [80] сконцентрировались на роли нарушения митохондриальных пор (mitochondrial permeability transition pores, mPTP) в патогенезе болезни Альцгеймера. В основу гипотезы легли полученные ими доказательства о регулирующем влиянии  $17\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы типа 10 ( $17\beta$ -HSD10) на циклофилин D (CypD) в митохондриальном матриксе. Первый из этих белков (вместе с паркином) является важным участником контроля качества митохондрий. Дегидрогеназа  $17\beta$ -HSD10 известна как белок, связывающий  $\beta$ -амилоид в головном мозге людей с болезнью Альцгеймера, что играет важную роль в развитии митохондриальной дисфункции при этом заболевании. В свою очередь, CypD является белком внутренней митохондриальной мембраны, регулирующим работу mPTP. Ранее только высказывались предположения о возможном взаимодействии  $17\beta$ -HSD10 и CypD. В цитируемой работе авторы нашли этой гипотезе практическое подтверждение, изучая митохондрии, выделенные из мозга животных трансгенной модели болезни Альцгеймера (McGill-R-

Thy1-APP), а также из ликвора пациентов с этим заболеванием. Они наблюдали и впервые определили кинетические параметры взаимодействия между указанными белками в режиме реального времени с помощью 6-канальной платформы SPR (surface plasmon resonance biosensor) на основе длинноволновой спектроскопии поверхностного плазмонного резонанса на приборе Plasmon VI с бездисперсионной микрофлюидикой (Институт фотоники и электроники, Чехия). Снижение по сравнению с контролем содержания комплексов  $17\beta$ -HSD10–CypD у крыс McGill-R-Thy1-APP коррелировало с накоплением  $\beta$ -амилоида. Кроме того, уровни указанных комплексов были снижены у пациентов с легкими когнитивными нарушениями, с деменцией или лобно-височной лобарной дегенерацией. Авторы предположили, что прямое действие  $\beta$ -амилоида как на  $17\beta$ -HSD10, так и на его связь с CypD может приводить к критическим нарушениям проницаемости mPTP.

#### **«ВТОРИЧНОСТЬ» МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПОРАЖЕНИЯ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

Eric Schon et al. из Колумбийского университета [2] высказали гипотезу о том, что несмотря на то, что все вышеприведенные нарушения могут наблюдаться еще до образования амилоидных бляшек, указанная митохондриальная дисфункция не является первопричиной болезни Альцгеймера. В доказательство этого они сформулировали несколько положений:

1. Первой группой доказательств авторы считают отсутствие признаков болезни Альцгеймера у пациентов различного возраста с «первичными» митохондриальными болезнями. Последние при этом характеризуются множеством нарушений, которые не наблюдаются при болезни Альцгеймера, такими как энцефалопатия, миопатия, дефекты органов чувств, эндокринопатия, дисфункции желудочно-кишечного тракта и почек.

2. Во-вторых, вышеперечисленные митохондриальные нарушения могут иметь место при других заболеваниях, в том числе нейродегенеративных. Так, перинуклеарные митохондрии встречаются при болезни Гентингтона, боковом амиотрофическом склерозе, а также при летальной энцефалопатии, вызванной мутацией гена белка митохондриального деления Drp1.

3. Наконец, перинуклеарное расположение митохондрий может быть вызвано повышенной экспрессией белка митохондриального деления Fis1 и tau-белка.

По мнению авторов, эти данные демонстрируют, что вышеописанные митохондриальные дисфункции, вероятно, являются следствием других, более специфических первичных событий в манифестации болезни Альцгеймера и не являются основной причиной ее патогенеза [2].

### **ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ НОВЫХ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

Разработка подходов к таргетной терапии митохондриальной дисфункции при болезни Альцгеймера невозможна без параллельного развития диагностических подходов для раннего выявления таких нарушений.

Определение митохондриальной гаплогруппы может послужить предиктивным биомаркером, позволяющим оценить риск развития болезни Альцгеймера ещё до появления первых симптомов и осуществлять профилактические превентивные меры. Учитывая, что наиболее точное определение гаплогруппы требует секвенирования митохондриального генома целиком, одновременно можно выявлять и другие точечные мутации мтДНК, не ассоциированные с гаплогруппой, но также являющиеся факторами риска. Возможности для такой диагностики предоставляют как технологии секвенирования нового поколения, так и классический метод секвенирования по Сэнгеру с использованием капиллярного электрофореза. Однако на текущий момент достоверных ассоциаций генотипа с клиническим фенотипом не существует. Несовершенны и протоколы превентивных мер, которые следует осуществлять при выявлении генетических факторов риска. Учитывая это, а также высокую стоимость и сложность генетического анализа, этот подход вызывает пока скорее интерес фундаментальной науки.

Метаболомные исследования являются на сегодняшний день наиболее распространенным способом детекции митохондриальных нарушений. Существуют специальные протоколы, позволяющие оценить эффективность работы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) по соотношению количества различных субстратов, а также их молекулярных предшественников [81]. Применяется и прямое измерение количества комплексов ЭТЦ, в основном II и IV. Часто рассматривается соотношение  $\text{НАД}^+/\text{НАДН}$  [82].

Основным недостатком метаболомной диагностики является ограниченная предиктивность: изменения на уровне порога чувствительности современных анализаторов предполагают

либо наличие каких-либо клинических симптомов болезни Альцгеймера, либо их скорую манифестацию. Короткий прогностический период ограничивает возможности контроля и мер по борьбе с заболеванием [83]. Кроме того, слабым местом существующих метаболомных маркеров является их низкая специфичность. Наличие признаков митохондриальных нарушений не позволяет определить их первичность в патогенезе или хотя бы установить прямую ассоциацию с патогенезом болезни Альцгеймера.

Учитывая преимущества и недостатки геномных и метаболомных исследований, наиболее перспективным диагностическим инструментом выглядит анализ экспрессии генов. РНК, являющаяся промежуточным звеном между геном и белком, формирующим фенотип, отражает как устойчивые неизменные характеристики, так и динамические процессы в клетке. С помощью анализа экспрессии генов можно выявить новые ассоциации между митохондриальными нарушениями и патогенезом болезни Альцгеймера. Благодаря этому станет возможным создание новых, более специфичных диагностических панелей, в том числе и метаболомных. Для подобных научно-медицинских задач анализ целого транскриптома выглядит избыточным. Наиболее целесообразным представляется использование небольших, до нескольких сотен генов, таргетных панелей на микрочиповых («Illumina», «Ion» Ampliseq и др.) или микрофлюидных (например, «NanoString») платформах.

### **ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗРАБОТКИ ТАРГЕТНОЙ КОРРЕКЦИИ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ НАРУШЕНИЙ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА**

Накопление данных о связи митохондриальной дисфункции с нейродегенерацией актуализировало поиск таргетных митохондриальных средств, перспективных для лечения болезни Альцгеймера. Потенциальными целями при этом могут быть повышение эффективности работы электрон-транспортной цепи и синтеза АТФ, антиоксидантная активность (поглощение активных форм кислорода и уменьшение окислительного повреждения), регуляция метаболизма глюкозы, оптимизация митохондриальной динамики и биогенеза [20].

Одним из направлений поиска таргетной терапии является восстановление работы митохондрий с помощью различных антиоксидантов [84]. Накапливаются данные о том, что антиоксиданты способны снижать или даже нивелировать токсичное действие  $\beta$ -амилоида [85].

Одним из наиболее распространенных антиоксидантов считается кофермент Q10 (CoQ10, убихинон), который является важным кофактором ЭТЦ в митохондриях, регулирующим генерацию активных форм кислорода (АФК), окислительный стресс и воспаление. На *in vitro* и *in vivo* моделях болезни Альцгеймера было продемонстрировано нейропротекторное действие CoQ10 [86]. В одном из таких исследований, к примеру, изучали действие CoQ10 на нарушение гиппокампальной долговременной потенциации, вызванное накоплением  $\beta$ -амилоида у крыс. Было показано, что за счет своих антиоксидантных свойств CoQ10 оказывал протекторное действие на синаптическую пластичность, нарушаемую действием  $\beta$ -амилоида [87]. Активно изучается и липофильный синтетический аналог CoQ10, идебенон, который также снижает вызванную  $\beta$ -амилоидом нейротоксичность [86]. Помимо этого, на первичной культуре кортикальных нейронов была продемонстрирована возможность использования идебенона в качестве превентивной терапии. При обработке клеток препаратом перед добавлением  $\beta$ -амилоида наблюдалось значительное снижение негативного эффекта  $\beta$ -амилоида на биоэнергетику митохондрий и работу PKA/CREB сигнального пути [88]. К препаратам, основанным на CoQ10, относится и MitoQ, который представляет собой комплекс из убихинона и трифенилфосфония (ТФФ), липофильного катиона, широко используемого для таргетной доставки различных антиоксидантов в митохондрии [86]. MitoQ снижает нейрональное воспаление, демиелинизацию, способствует ремиелинизации, защищает от прогрессирования потери ментальных функций, в том числе потери памяти [85]. Важно отметить, что в случае с MitoQ для терапии нейродегенеративных заболеваний подбор оптимальной дозировки критически важен, поскольку MitoQ становится токсичен для нейрональных клеток при концентрациях выше 0,3 мкМ. В настоящее время идет набор пациентов с болезнью Альцгеймера в клиническое исследование с MitoQ (NCT03514875, <https://clinicaltrials.gov/>). Антиоксиданты семейства SkQ также обладают нейропротекторным действием. В отличие от MitoQ активным веществом этих митохондриально-направленных молекул является пластохинон. В частности, было показано, что интраперитонеальное введение SkQ крысам предотвращало вызванные  $\beta$ -амилоидом нарушения в гиппокампе [89]. ТФФ также входит в состав MitoVitE, обеспечивая доставку в митохондрии конъюгированного  $\alpha$ -токоферола (витамин E), который предотвращает окислительный стресс за счет ингибирования перекисного

окисления липидов. В рамках исследования на фибробластах пациентов с атаксией Фридрейха *in vitro* было показано, что терапевтический эффект MitoVitE в разы сильнее, чем у его конкурента тролокса – водорастворимого аналога витамина E без таргетной доставки в митохондрии [85]. Еще одним препаратом с ТФФ-опосредованной таргетной доставкой является MitoTEMPO, SOD-миметик, который приводит к снижению  $\beta$ -амилоид-индуцированного перекисного окисления липидов и в целом окислительного стресса [86].

Таргетной митохондриальной направленностью и антиоксидантным действием обладает также группа малых молекул, положительно заряженных тетрапептидов, так называемых SS-пептидов (Szeto-Schiller). Один из этих пептидов, SS-31, обладает высокой антиоксидантной активностью и предотвращает перекисное окисление липидов, пероксидазную активность цитохрома C, а также снижает генерацию АФК. При инкубации клеток нейробластомы мыши N2a с  $\beta$ -амилоидом SS-31 обеспечивал нормальную работу митохондрий за счет поддержания мембранного потенциала. При его действии также ингибировалось расщепление (деление) митохондрий и резко повышалась экспрессия нейропротекторных генов *PGC1 $\alpha$* , *FOXO1* и рецептора NMDA. Отметим, что защитное действие SS-31 усиливается при использовании его в комбинации с другим препаратом, Mdivi-1, что было показано на клетках N2a. Еще одним аргументом в пользу таргетных препаратов являются данные о том, что по сравнению с ресвератролом, который является ненаправленным антиоксидантом, MitoQ и SS-31 показали большую эффективность в защите клеток от  $\beta$ -амилоид-индуцированной токсичности [85].

Другим антиоксидантом, обладающим нейропротекторным потенциалом при различных нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера, является креатин. Механизм его действия основан на ингибировании формирования mPTP в митохондриях, предотвращая их гибель. При этом интересно отметить, что на модели болезни Альцгеймера у мышей впервые было показано, что эффект креатина на поведенческие реакции у самок был значительно сильнее, чем у самцов, хотя улучшение биоэнергетики митохондрий в ответ на креатин от пола животных не зависело [86, 90]. Липоевая кислота также является антиоксидантом и играет роль в кислородном метаболизме, являясь коферментом митохондриальной пируватдегидрогеназы и  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназы. В одном из пилотных клинических исследований (NCT00090402, <https://clinicaltrials.gov/>)



на 39 пациентах с болезнью Альцгеймера применение липоевой кислоты в комбинации с омега-3 жирными кислотами замедлило снижение когнитивных функций [91].

Еще одним кандидатом для терапии болезни Альцгеймера является метиленовый синий. Этот краситель способен подавлять агрегацию тау-белка, может выступать в качестве антиоксиданта, а также кофактора митохондриально-нацеленной каталазы, тем самым минимизируя избыточную генерацию АФК [86]. На модели хронической церебральной гипоперфузии у крыс было впервые показано, что метиленовый синий предотвращает нейродегенерацию и нарушение памяти за счет сохранения цитохром-оксидазной активности [92].

Целую группу веществ, выделяемых из растений и способных уменьшать воспаление и окислительный стресс, представляют кумарины. Механизм их действия основан на усилении Nrf2/ARE сигнального пути в ходе индуцирования экспрессии различных цитопротекторных и генов детоксикации. К примеру, один из кумаринов, дафнетин, предотвращает снижение мембранного потенциала и потерю цитохрома С в митохондриях. Сигнальный путь Nrf2 также участвует в обеспечении нейропротекторного действия производного кумарина, остола. При инкубировании с клетками остол снижал уровень апоптоза, ингибировал действие каспаз-3, -8, -9, восстанавливал нарушенный митохондриальный мембранный потенциал, снижал избыточную генерацию АФК и наряду с Nrf2 регулировал уровень экспрессии *Bcl-2* и *Bax*. В трансгенных APP/PS1 мышях введение остола облегчало патологии, связанные с нарушением памяти и когнитивных функций. Также увеличивалась экспрессия SOD-1 и HO-1, вовлеченных в сигнальный путь Nrf2. В совокупности эти данные свидетельствуют в пользу опосредованного Nrf2 снижения окислительного стресса, обуславливающего нейропротекторное действие остола [93].

Из ризома *Curcuma longa* выделяют вещество куркумин, обладающее антиамилоидными свойствами. Липофильные характеристики позволяют куркумину проходить через гематоэнцефалический барьер, а также связываться с  $\beta$ -амилоидом. Как *in vitro*, так и *in vivo* было показано, что куркумин способен ингибировать агрегацию  $\beta$ -амилоида, а также приводить к расформированию его уже сгруппированных скоплений [85]. Перспективным средством в отношении лечения болезни Альцгеймера является синтетическое производное куркумина, препарат J147, воздействующий на работу V комплекса дыхательной цепи. Он показал свою эффек-

тивность в различных экспериментах, где в качестве маркеров использовалось количество накопленного  $\beta$ -амилоида. Данный препарат также улучшал результаты физиологического тестирования различных видов памяти [94]. Однако очевидно, что обладая плейотропным действием, он влияет также на АМР-активируемую протеинкиназу (АМРК) и через последнюю на комплексы mTOR (mammalian target of rapamycin) и ACC1 (acetyl-CoA carboxylase). Все это в целом оптимизирует клеточный энергообмен и замедляет процессы клеточного повреждения, в том числе при нейродегенерации и старении [20, 95, 96].

Ранее уже упоминалась работа по применению пептида P110, который избирательно снижает связывание Drp1 с митохондриями [67]. Помимо опытов *in vitro* были выполнены эксперименты на животных. Ежедневное в течение 3 мес. введение P110 мышам с моделированной болезнью Альцгеймера (5XFAD) привело к значительному снижению накопленного  $\beta$ -амилоида в митохондриальной фракции. У контрольных 5XFAD (не получавших P110) мышей уровень АТФ в лизатах мозга был на 40% ниже, чем у мышей дикого типа, однако прием P110 сглаживал эту разницу. Пептид также уменьшал перекисное окисление липидов, двукратное увеличение связывания Drp1 с митохондриями у трансгенных мышей полностью ингибировалось в результате приема P110. Оценка когнитивных способностей животных проводилась путем наблюдения за обустройством гнезд. Контрольные 5XFAD мыши резко теряли способность строить гнезда, но применение P110 улучшало их показатели. Также P110 приводил к частичной коррекции моторных дефектов, наблюдавшихся у мышей в контроле (модели болезни). Данная работа получила свое развитие, когда эта же группа ученых исследовала влияние P110 на высвобождение фрагментированных митохондрий из клеток микроглии, что могло стать триггером распространения повреждения по нервной ткани за счет запуска процессов нейровоспаления. Количество фрагментированных митохондрий, коррелирующее со степенью последующего повреждения нейронов, определяется Fis1-опосредованной фрагментацией митохондрий внутри глиальных клеток. Снижение деления митохондрий под действием P110 и, соответственно, уменьшение последующего выхода поврежденных органелл из микроглии ингибировало активацию астроцитов и обеспечивало защиту нейронов от иммунного ответа [97].

С целью препятствия взаимодействию  $\beta$ -амилоида с Drp1 на основе нейротрансмиттера

допамина была создана молекула DDQ (diethyl (3,4-dihydroxyphenethylamino) (quinolin-4-yl) methylphosphonate), которая обладает способностью связываться с  $\beta$ -амилоидом, тем самым ингибируя нарушение регуляции Drp1, что было показано на культуре клеток нейробластомы человека SH-SY5Y. В этом же русле проводятся исследования ингибитора деления митохондрий Mdivi-1, механизм действия которого, вероятно, связан со снижением гиперэкспрессии Drp1 и Fis1 [85].

Другим направлением поиска возможных терапевтических агентов являются исследования рецептора гормона эстрогена ER $\beta$ , расположенного на митохондриях. При связывании с рецептором эстроген способствует активации работы митохондрий. В качестве потенциального агента был предложен S-equol, который является агонистом ER $\beta$ . Несмотря на то что точные механизмы действия S-equol пока не изучены, данные о его нейропротекторных свойствах настолько перспективны [98], что уже ведутся клинические исследования, в данный момент идет набор пациентов с болезнью Альцгеймера (NCT03101085, <https://clinicaltrials.gov>).

Таким образом, способность митохондрий изменять свою морфологию, число и функционирование в зависимости от физиологических условий, в том числе в ответ на различные стрессовые воздействия, отражает их высокую динамичность и одну из ключевых ролей в поддержании клеточной жизнедеятельности. Накопленный объем знаний демонстрирует влияние мито-

хондриальных патологий на изменение метаболизма нервных клеток, нейровоспаление и потерю синапсов. Нарушение циклов слияния-деления митохондрий, целостности мтДНК, изменение содержания митохондриальных белков и липидов и другие описанные процессы — все эти аспекты работы митохондрий в той или иной степени задействованы при развитии нейродегенеративных заболеваний, в том числе болезни Альцгеймера. В последнее время накапливается всё больше данных о гетерогенности и вариабельности болезни Альцгеймера, что требует поиска терапевтических решений, нацеленных на различные мишени. Митохондрии, работа которых претерпевает значительные нарушения в ходе заболевания, являются одной из таких мишеней. В то время как митохондриальные терапевтические стратегии показали многообещающие результаты на доклинической стадии, в клинических испытаниях прогресс был малозначительным. В связи с этим становится очевидной острая необходимость дальнейших исследований по изучению механизмов регуляции митохондриального гомеостаза с целью выявления потенциальных кандидатов, способных таргетно регулировать нормальную работу митохондрий для сохранения когнитивных функций.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hardy, J. A., and Higgins, G. A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis, *Science*, **256**, 184-185, doi: 10.1126/science.1566067.
- Area-Gomez, E., de Groof, A., Bonilla, E., Montesinos, J., Tanji, K., et al. (2018) A key role for MAM in mediating mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease, *Cell Death Dis.*, **9**, 335, doi: 10.1038/s41419-017-0215-0.
- Mravec, B., Horvathova, L., and Padova, A. (2018) Brain under stress and Alzheimer's disease, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **38**, 73-84, doi: 10.1007/s10571-017-0521-1.
- Armstrong, R. A. (2019) Risk factors for Alzheimer's disease, *Folia Neuropathol.*, **57**, 87-105, doi: 10.5114/fn.2019.85929.
- Hoeijmakers, L., Ruigrok, S. R., Amelanchik, A., Ivan, D., van Dam, A. M., et al. (2017) Early-life stress lastingly alters the neuroinflammatory response to amyloid pathology in an Alzheimer's disease mouse model, *Brain Behav. Immun.*, **63**, 160-175, doi: 10.1016/j.bbi.2016.12.023.
- Piirainen, S., Youssef, A., Song, C., Kalueff, A. V., Landreth, G. E., et al. (2017) Psychosocial stress on neuroinflammation and cognitive dysfunctions in Alzheimer's disease: the emerging role of microglia? *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **77**, 148-164, doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.01.046.
- Lahiri, D. K., and Maloney, B. (2010) The "LEARn" (Latent Early-life Associated Regulation) model integrates environmental risk factors and the developmental basis of Alzheimer's disease, and proposes remedial steps, *Exp. Gerontol.*, **45**, 291-296, doi: 10.1016/j.exger.2010.01.001.
- Moreira, P. I., Carvalho, C., Zhu, X., Smith, M. A., and Perry, G. (2010) Mitochondrial dysfunction is a trigger of Alzheimer's disease pathophysiology, *Biochim. Biophys. Acta*, **1802**, 2-10, doi: 10.1016/j.bbadis.2009.10.006.
- Santos, R. X., Correia, S. C., Wang, X., Perry, G., Smith, M. A., et al. (2010) A synergistic dysfunction of mitochondrial fission/fusion dynamics and mitophagy in Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, **20** Suppl. 2, 401-412, doi: 10.3233/JAD-2010-100666.
- Su, B., Wang, X., Bonda, D., Perry, G., Smith, M., and Zhu, X. (2010) Abnormal mitochondrial dynamics — a novel therapeutic target for Alzheimer's disease? *Mol. Neurobiol.*, **41**, 87-96, doi: 10.1007/s12035-009-8095-7.

11. Coskun, P. E., Wyrembak, J., Schriener, S., Chen, H. W., Marciniack, C., et al. (2013) A mitochondrial etiology of Alzheimer's and Parkinson's disease, *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 553-564, doi: 10.1016/j.bbagen.2011.08.008.
12. Spuch, C., Ortolano, S., and Navarro, C. (2012) New insights in the amyloid-beta interaction with mitochondria, *J. Aging Res.*, **2012**, 324968, doi: 10.1155/2012/324968.
13. Young-Collier, K. J., McArdle, M., and Bennett, J. P. (2012) The dying of the light: mitochondrial failure in Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, **28**, 771-781, doi: 10.3233/JAD-2011-111487.
14. Swerdlow, R. H., Burns, J. M., and Khan, S. M. (2014) The Alzheimer's disease mitochondrial cascade hypothesis: progress and perspectives, *Biochim. Biophys. Acta*, **1842**, 1219-1231, doi: 10.1016/j.bbadis.2013.09.010.
15. Cabezas-Opazo, F. A., Vergara-Pulgar, K., Pérez, M. J., Jara, C., Osorio-Fuentealba, C., and Quintanilla, R. A. (2015) Mitochondrial dysfunction contributes to the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2015**, 509654, doi: 10.1155/2015/509654.
16. Demetrius, L. A., and Driver, J. A. (2015) Preventing Alzheimer's disease by means of natural selection, *J. R. Soc. Interface*, **12**, 20140919, doi: 10.1098/rsif.2014.0919.
17. Cai, Q., and Tammineni, P. (2016) Alterations in mitochondrial quality control in Alzheimer's disease, *Front. Cell. Neurosci.*, **10**, 24, doi: 10.3389/fncel.2016.00024.
18. Sukhorukov, V. S., Voronkova, A. S., Litvinova, N. A., Baranich, T. I., and Illarioshkin, S. N. (2020) The role of mitochondrial DNA individuality in the pathogenesis of Parkinson's disease, *Russ. J. Genet.*, **56**, 392-400.
19. Lukyanova, L. D. (2019) Signaling mechanisms of hypoxia, *Moscow: RAS*, p. 215.
20. Lanzillotta, C., Di Domenico, F., Perluigi, M., Butterfield, D. A. (2019) Targeting mitochondria in Alzheimer disease: rationale and perspectives, *CNS Drugs*, **33**, 957-969, doi: 10.1007/s40263-019-00658-8.
21. Picone, P., Nuzzo, D., Giacomazza, D., and Carlo, M. D. (2020)  $\beta$ -Amyloid peptide: the cell compartment multifaceted interaction in Alzheimer's disease, *Neurotox. Res.*, **37**, 250-263, doi: 10.1007/s12640-019-00116-9.
22. Beal, M. F. (1996) Mitochondria, free radicals and neurodegeneration, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **6**, 661-666, doi: 10.1016/s0959-4388(96)80100-0.
23. Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J. P., and Gibson, G. E. (2005) Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications, *Ann. Neurol.*, **57**, 695-703, doi: 10.1002/ana.20474.
24. Wallace, D. C. (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine, *Annu. Rev. Genet.*, **39**, 359-407, doi: 10.1146/annurev.genet.39.110304.095751.
25. Sims, N. R., Finegan, J. M., Blass, J. P., Bowen, D. M., and Neary, D. (1987) Mitochondrial function in brain tissue in primary degenerative dementia, *Brain Res.*, **436**, 30-38, doi: 10.1016/0006-8993(87)91553-8.
26. Aksenov, M. Y., Tucker, H. M., Nair, P., Aksenova, M. V., Butterfield, D. A., et al. (1999) The expression of several mitochondrial and nuclear genes encoding the subunits of electron transport chain enzyme complexes, cytochrome *c* oxidase and NADH dehydrogenase, in different brain regions in Alzheimer's disease, *Neurochem. Res.*, **24**, 767-774, doi: 10.1023/A:1020783 614031.
27. Parker, W. D. Jr., Filley, C. M., and Parks, J. K. (1990) Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease, *Neurology*, **40**, 1302-1303, doi: 10.1212/WNL.40.8.1302.
28. Parker, W. D. Jr., Parks, J., Filley, C. M., and Kleinschmidt-Demasters, B. K. (1994) Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain, *Neurology*, **44**, 1090-1096, doi: 10.1212/WNL.44.6.1090.
29. Maurer, I., Zierz, S., and Möller, H. J. (2000) A selective defect of cytochrome *c* oxidase is present in brain of Alzheimer's disease patients, *Neurobiol. Aging*, **21**, 455-462, doi: 10.1016/s0197-4580(00)00112-3.
30. Kish, S. J., Mastrogiacomo, F., Guttman, M., Furukawa, Y., Taanman, J. W., et al. (1999) Decreased brain protein levels of cytochrome oxidase subunits in Alzheimer's disease and in hereditary spinocerebellar ataxia disorders: a nonspecific change? *J. Neurochem.*, **72**, 700-707, doi: 10.1046/j.1471-4159.1999.0720700.x.
31. Ohta, S., and Ohsawa, I. (2006) Dysfunction of mitochondria and oxidative stress in the pathogenesis of Alzheimer's disease: on defects in the cytochrome *c* oxidase complex and aldehyde detoxification, *J. Alzheimers Dis.*, **9**, 155-166, doi: 10.3233/jad-2006-9208.
32. Wilkins, H. M., and Swerdlow, R. H. (2017) Amyloid precursor protein processing and bioenergetics, *Brain Res. Bull.*, **133**, 71-79, doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.08.009.
33. Gibson, G. E., Chen, H. L., Xu, H., Qiu, L., Xu, Z., et al. (2012) Deficits in the mitochondrial enzyme  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase lead to Alzheimer's disease-like calcium dysregulation, *Neurobiol. Aging*, **33**, 1121.e13-24, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.11.003.
34. Manczak, M., Anekonda, T. S., Henson, E., Park, B. S., Quinn, J., and Reddy, P. H. (2006) Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression, *Hum. Mol. Genet.*, **15**, 1437-1449, doi: 10.1093/hmg/ddl066.
35. Nunomura, A., Castellani, R. J., Zhu, X., Moreira, P. I., Perry, G., and Smith, M. A. (2006) Involvement of oxidative stress in Alzheimer's disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **65**, 631-641, doi: 10.1097/01.jnen.0000228136.58062.bf.
36. Riemer, J., and Kins, S. (2013) Axonal transport and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease, *Neurodegener. Dis.*, **12**, 111-124, doi: 10.1159/000342020.
37. Bonda, D. J., Wang, X., Perry, G., Smith, M. A., and Zhu, X. (2010) Mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease: opportunities for future treatment strategies, *Drugs Aging*, **27**, 181-192, doi: 10.2165/11532140-000000000-00000.
38. Nakamura, T., Cieplak, P., Cho, D. H., Godzik, A., and Lipton, S. A. (2010) S-nitrosylation of Drp1 links excessive mitochondrial fission to neuronal injury in neurodegeneration, *Mitochondrion*, **10**, 573-578, doi: 10.1016/j.mito.2010.04.007.
39. Poirier, Y., Grimm, A., Schmitt, K., and Eckert, A. (2019) Link between the unfolded protein response and dysregulation of mitochondrial bioenergetics in Alzheimer's disease, *Cell. Mol. Life Sci.*, **76**, 1419-1431, doi: 10.1007/s00018-019-03009-4.
40. Hu, H., Tan, C. C., Tan, L., and Yu, J. T. (2017) A mitochondria-centric view of Alzheimer's disease, *Mol. Neurobiol.*, **54**, 6046-6060, doi: 10.1007/s12035-016-0117-7.
41. Györfy, B. A., Tóth, V., Török, G., Gulyássi, P., Kovács, R. Á., et al. (2020) Synaptic mitochondrial dysfunction and septin accumulation are linked to complement-mediated synapse loss in an Alzheimer's disease animal model, *Cell. Mol. Life Sci.*, doi: 10.1007/s00018-020-03468-0.
42. Sukhorukov, V. S. (2011) Individual peculiarities of tissue energy metabolism and their role in the development of childhood diseases, *Ros. Vestn. Perinatol. Pediat.*, **56**, 4-11.

43. Sukhorukov, V. S. (2011) Notes on mitochondrial pathology, *Medpraktika-M*, Moscow, p. 288.
44. Sukhorukov, V. S., Voronkova, A. S., Litvinova, N. A., Baranich, T. I., and Kharlamov, D. A. (2017) Significance of mitochondrial individuality, *Adaptation Biology and Medicine* (Kawai, Y., Hargens, A. R., and Singal, P. K., eds.) Vol. 8 Current Trends, Narosa Publishing House Pvt. Ltd., New Dehli, India, p. 27-41.
45. Skulachev, V. P. (2006) Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis, *Apoptosis*, **11**, 473-485, doi: 10.1007/s10495-006-5881-9.
46. O'Mealey, G. B., Plafker, K. S., Berry, W. L., Janknecht, R., Chan, J. Y., and Plafker, S. M. (2017) A PGAM5-KEAP1-Nrf2 complex is required for stress-induced mitochondrial retrograde trafficking, *J. Cell Sci.*, **130**, 3467-3480, doi: 10.1242/jcs.203216.
47. Trougakos, I. P. (2019) Nrf2, stress and aging, *Aging (Albany NY)*, **11**, 5289-5291, doi: 10.18632/aging.102143.
48. Tsakiri, E. N., Gumeni, S., Iliaki, K. K., Benaki, D., Vougas, K., et al. (2019) Hyperactivation of Nrf2 increases stress tolerance at the cost of aging acceleration due to metabolic deregulation, *Aging Cell*, **18**, e12845, doi: 10.1111/acel.12845.
49. Sabouny, R., Fraunberger, E., Geoffrion, M., Ng, A. C., Baird, S. D., et al. (2017) The Keap1-Nrf2 stress response pathway promotes mitochondrial hyperfusion through degradation of the mitochondrial fission protein Drp1, *Antioxid. Redox Signal.*, **27**, 1447-1459, doi: 10.1089/ars.2016.6855.
50. Santoro, A., Balbi, V., Balducci, E., Pirazzini, C., Rosini, F., et al. (2010) Evidence for sub-haplogroup h5 of mitochondrial DNA as a risk factor for late onset Alzheimer's disease, *PLoS One*, **5**, e12037, doi: 10.1371/journal.pone.0012037.
51. Ridge, P. G., Koop, A., Maxwell, T. J., Bailey, M. H., Swerdlow, R. H., et al. (2013) Alzheimer's disease neuroimaging initiative. Mitochondrial haplotypes associated with biomarkers for Alzheimer's disease, *PLoS One*, **8**, e74158, doi: 10.1371/journal.pone.0074158.
52. Krishnan, K. J., Ratnaik, T. E., De Gruyter, H. L., Jaros, E., and Turnbull, D. M. (2012) Mitochondrial DNA deletions cause the biochemical defect observed in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*, **33**, 2210-2214, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2011.08.009.
53. Coskun, P. E., Beal, M. F., and Wallace, D. C. (2004) Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 10726-10731, doi: 10.1073/pnas.0403649101.
54. Podlesniy, P., Figueiro-Silva, J., Llado, A., Antonell, A., Sanchez-Valle, R., et al. (2013) Low cerebrospinal fluid concentration of mitochondrial DNA in preclinical Alzheimer's disease, *Ann. Neurol.*, **74**, 655-668, doi: 10.1002/ana.23955.
55. Lunnon, K., Keohane, A., Pidsley, R., Newhouse, S., Riddoch-Contreras, J., et al. (2017) Mitochondrial genes are altered in blood early in Alzheimer's disease, *Neurobiol. Aging*, **53**, 36-47, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.12.029.
56. Mancuso, M., Calsolaro, V., Orsucci, D., Siciliano, G., and Murri, L. (2009) Is there a primary role of the mitochondrial genome in Alzheimer's disease? *J. Bioenerg. Biomembr.*, **41**, 411-416, doi: 10.1007/s10863-009-9239-1.
57. Karch, C. M., and Goate, A. M. (2015) Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis, *Biol. Psychiatry*, **77**, 43-51, doi: 10.1016/j.biopsych.2014.05.006.
58. Sukhorukov, V. S., Voronkova, A. S., and Litvinova, N. A. (2015) Clinical relevance of individual mitochondrial DNA characteristics, *Russ. Bull. Perinatol. Pediatr.*, **60**, 10-21.
59. Wallace, D. (2007) Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine, *Annu. Rev. Biochem.*, **76**, 781-821, doi: 10.1146/annurev.biochem.76.081205.150955.
60. Bi, R., Zhang, W., Yu, D., Li, X., Wang, H. Z., et al. (2015) Mitochondrial DNA haplogroup B5 confers genetic susceptibility to Alzheimer's disease in Han Chinese, *Neurobiol. Aging*, **36**, 1604, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.10.009.
61. Shoffner, J. M., Brown, M. D., Torroni, A., Lott, M. T., Cabell, M. F., et al. (1993) Mitochondrial DNA variants observed in Alzheimer's disease and Parkinson's disease patients, *Genomics*, **17**, 171-184, doi: 10.1006/geno.1993.1299.
62. Bandelt, H., Kloss-Brandstatter, A., and Richards, M. (2014) The case for the continuing use of the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS) and the standardization of notation in human mitochondrial DNA studies, *J. Hum. Genet.*, **59**, 66-77, doi: 10.1038/jhg.2013.120.
63. Marom, S., Friger, M., and Mishmar, D. (2017) MtDNA meta-analysis reveals both phenotype specificity and allele heterogeneity: a model for differential association, *Sci. Rep.*, **7**, 43449, doi: 10.1038/srep43449.
64. Swerdlow, R. H., Koppel, S., Weidling, I., Hayley, C., Ji, Y., and Wilkins, H. M. (2017) Mitochondria, cybrids, aging, and Alzheimer's disease, *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, **146**, 259-302, doi: 10.1016/bs.pmbts.2016.12.017.
65. Burté, F., Carelli, V., Chinnery, P. F., and Yu-Wai-Man, P. (2015) Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders, *Nat. Rev. Neurol.*, **11**, 11-24, doi: 10.1038/nrneurol.2014.228.
66. Cho, D. H., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., et al. (2009) S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury, *Science*, **324**, 102-105, doi: 10.1126/science.1171091.
67. Joshi, A. U., Saw, N. L., Shamloo, M., and Mochly-Rosen, D. (2018) Drp1/Fis1 interaction mediates mitochondrial dysfunction, bioenergetic failure and cognitive decline in Alzheimer's disease, *Oncotarget*, **9**, 6128-6143, doi: 10.18632/oncotarget.23640.
68. More, J., Galusso, N., Veloso, P., Montecinos, L., Finkelstein, J. P., et al. (2018) N-acetylcysteine prevents the spatial memory deficits and the redox-dependent RyR2 decrease displayed by an Alzheimer's disease rat model, *Front. Aging Neurosci.*, **10**, 399, doi: 10.3389/fnagi.2018.00399.
69. Kirouac, L., Rajic, A. J., Cribbs, D. H., and Padmanabhan, J. (2017) Activation of ras-ERK signaling and GSK-3 by amyloid precursor protein and amyloid beta facilitates neurodegeneration in Alzheimer's disease, *eNeuro*, **4**, ENEURO.0149-16.2017, doi: 10.1523/ENEURO.0149-16.2017.
70. Giorgi, C., Missiroli, S., Patergnani, S., Duszynski, J., Wieckowski, M. R., and Pinton, P. (2015) Mitochondria-associated membranes: composition, molecular mechanisms, and physiopathological implications, *Antioxid. Redox Signal.*, **22**, 995-1019, doi: 10.1089/ars.2014.6223.
71. Bononi, A., Missiroli, S., Poletti, F., Suski, J. M., Agnoletto, C., et al. (2012) Mitochondria-associated membranes (MAMs) as hotspot Ca<sup>2+</sup> signaling units, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **740**, 411-437, doi: 10.1007/978-94-007-2888-2\_17.

72. Völgyi, K., Badics, K., Sialana, F. J., Gulyácssy, P., Udvari, E. B., et al. (2018) Early presymptomatic changes in the proteome of mitochondria-associated membrane in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 7839-7857, doi: 10.1007/s12035-018-0955-6.
73. Contino, S., Porporato, P. E., Bird, M., Marinangeli, C., Opsomer, R., et al. (2017) Presenilin 2-dependent maintenance of mitochondrial oxidative capacity and morphology, *Front. Physiol.*, **8**, 796, doi: 10.3389/fphys.2017.00796.
74. Rodríguez-Arribas, M., Yakhine-Diop, S. M. S., Pedro, J. M. B., Gómez-Suaga, P., Gómez-Sánchez, R., et al. (2017) Mitochondria-associated membranes (MAMs): overview and its role in Parkinson's disease, *Mol. Neurobiol.*, **54**, 6287-6303, doi: 10.1007/s12035-016-0140-8.
75. Area-Gomez, E., and Schon, E. A. (2016) Mitochondria-associated ER membranes and Alzheimer's disease, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **38**, 90-96, doi: 10.1016/j.gde.2016.04.006.
76. Area-Gomez, E., Del Carmen Lara Castillo, M., Tambini, M. D., Guardia-Laguarta, C., de Groof, A. J., et al. (2012) Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer's disease, *EMBO J.*, **31**, 4106-4123, doi: 10.1038/emboj.2012.202.
77. Rusiño, A. E., Cui, Z., Chen, M. H., and Vance, J. E. (1994) A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins, *J. Biol. Chem.*, **269**, 27494-27502.
78. Martin, L. A., Kennedy, B. E., and Karten, B. (2016) Mitochondrial cholesterol: mechanisms of import and effects on mitochondrial function, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **48**, 137-151, doi: 10.1007/s10863-014-9592-6.
79. Hedskog, L., Pinho, C. M., Filadi, R., Ronnback, A., Hertwig, L., et al. (2013) Modulation of the endoplasmic reticulum-mitochondria interface in Alzheimer's disease and related models, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 7916-7921, doi: 10.1073/pnas.1300677110.
80. Kristofikova, Z., Springer, T., Gedeonova, E., Hofmannova, A., Rícný, J., et al. (2020) Interactions of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 10 and cyclophilin D in Alzheimer's disease, *Neurochem. Res.*, **45**, 915-927, doi: 10.1007/s11064-020-02970-y.
81. Esterhuizen, K., van der Westhuizen, F. H., and Louw, R. (2017) Metabolomics of mitochondrial disease, *Mitochondrion*, **35**, 97-110, doi: 10.1016/j.mito.2017.05.012.
82. Pflieger, J., He, M., and Abdellatif, M. (2015) Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival, *Cell Death Dis.*, **6**, e1835, doi: 10.1038/cddis.2015.202.
83. Bell, S. M., Barnes, K., De Marco, M., Shaw, P. J., Ferraiuolo, L., et al. (2021) Mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease: a biomarker of the future? *Biomedicines*, **9**, 63, doi: 10.3390/biomedicines9010063.
84. Grivennikova, V. G., and Vinogradov, A. D. (2013) Generation of active oxygen species by mitochondria, *Adv. Biol. Chem.*, **53**, 245-296.
85. Oliver, D. M. A., and Reddy, P. H. (2019) Small molecules as therapeutic drugs for Alzheimer's disease, *Mol. Cell. Neurosci.*, **96**, 47-62, doi: 10.1016/j.mcn.2019.03.001.
86. Van Giau, V., An, S. S. A., and Hulme, J. P. (2018) Mitochondrial therapeutic interventions in Alzheimer's disease, *J. Neurol. Sci.*, **15**, 62-70, doi: 10.1016/j.jns.2018.09.033.
87. Komaki, H., Faraji, N., Komaki, A., Shahidi, S., Etaee, F., et al. (2019) Investigation of protective effects of coenzyme Q10 on impaired synaptic plasticity in a male rat model of Alzheimer's disease, *Brain Res. Bull.*, **147**, 14-21, doi: 10.1016/j.brainresbull.2019.01.025.
88. Wang, H., Li, L., Jia, K., Wang, Q., Sui, S., et al. (2020) Idebenone protects mitochondrial function against amyloid beta toxicity in primary cultured cortical neurons, *Neuroreport*, **31**, 1104-1110, doi: 10.1097/WNR.0000000000001526.
89. Kapay, N. A., Isaev, N. K., Stelmashook, E. V., Popova, O. V., Zorov, D. B., et al. (2011) *In vivo* injected mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant SkQR1 prevents  $\beta$ -amyloid-induced decay of long-term potentiation in rat hippocampal slices, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1367-1370, doi: 10.1134/S0006297911120108.
90. Snow, W. M., Cadonic, C., Cortes-Perez, C., Adlimoghaddam, A., Roy Chowdhury, S. K., et al. (2020) Sex-specific effects of chronic creatine supplementation on hippocampal-mediated spatial cognition in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease, *Nutrients*, **12**, 3589, doi: 10.3390/nu12113589.
91. Shinto, L., Quinn, J., Montine, T., Dodge, H. H., Woodward, W., et al. (2014) A randomized placebo-controlled pilot trial of omega-3 fatty acids and alpha lipoic acid in Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.*, **38**, 111-120, doi: 10.3233/JAD-130722.
92. Auchter, A. M., Barrett, D. W., Monfils, M. H., and Gonzalez-Lima, F. (2020) Methylene blue preserves cytochrome oxidase activity and prevents neurodegeneration and memory impairment in rats with chronic cerebral hypoperfusion, *Front. Cell Neurosci.*, **14**, 130, doi: 10.3389/fncel.2020.00130.
93. Chu, Q., Zhu, Y., Cao, T., Zhang, Y., Chang, Z., et al. (2020) Studies on the neuroprotection of osthole on glutamate-induced apoptotic cells and an Alzheimer's disease mouse model via modulation oxidative stress, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **190**, 634-644, doi: 10.1007/s12010-019-03101-2.
94. Chen, Q., Prior, M., Dargusch, R., Roberts, A., Riek, R., et al. (2011) A novel neurotrophic drug for cognitive enhancement and Alzheimer's disease, *PLoS One*, **6**, e27865, doi: 10.1371/journal.pone.0027865.
95. Hardie, D. G., Ross, F. A., and Hawley, S. A. (2012) AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**, 251-262, doi: 10.1038/nrm3311.
96. Goldberg, J., Currais, A., Prior, M., Fischer, W., Chiruta, C., et al. (2018) The mitochondrial ATP synthase is a shared drug target for aging and dementia, *Aging Cell*, **17**, e12715, doi: 10.1111/acer.12715.
97. Joshi, A. U., Minhas, P. S., Liddel, S. A., Haileselassie, B., Andreasson, K. I., et al. (2019) Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration, *Nat. Neurosci.*, **22**, 1635-1648, doi: 10.1038/s41593-019-0486-0.
98. Tsai, M. C., Lin, S. H., Hidayah, K., and Lin, C. I. (2019) Equol pretreatment protection of SH-SY5Y cells against A $\beta$  (25-35)-induced cytotoxicity and cell-cycle reentry via sustaining estrogen receptor alpha expression, *Nutrients*, **11**, 2356, doi: 10.3390/nu11102356.

**MITOCHONDRIAL DISFUNCTION IN ALZHEIMER'S DISEASE****Review**

**V. S. Sukhorukov<sup>1</sup>, N. M. Mudzhiri<sup>1\*</sup>, A. S. Voronkova<sup>1</sup>,  
T. I. Baranich<sup>1,2</sup>, V. V. Glinkina<sup>2</sup>, and S. N. Illarioshkin<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Research Center of Neurology, 125367 Moscow, Russia*

<sup>2</sup> *Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov Medical University),  
117997 Moscow, Russia; e-mail: mudzhirinm@gmail.com*

Alzheimer's disease is the most common age-related neurodegenerative disease. Understanding of its etiology and pathogenesis is constantly expanding. Thus, the increasing attention of researchers is directed to the study of the role of mitochondrial disorders. In addition, in recent years, the concept of Alzheimer's disease as a stress-induced disease has begun to form more and more actively. The stress-induced damage to the neuronal system can trigger a vicious circle of pathological processes, among which mitochondrial dysfunctions have a significant place, since mitochondria represent a substantial component in the anti-stress activity of the cell. The study of mitochondrial disorders in Alzheimer's disease is relevant for at least two reasons: first, as important pathogenetic component in this disease; second, due to vital role of mitochondria in formation of the body resistance to various conditions, including stressful ones, throughout the life. This literature review analyzes the results of a number of recent studies assessing potential significance of the mitochondrial disorders in Alzheimer's disease. The probable mechanisms of mitochondrial disorders associated with the development of this disease are considered: bioenergetic dysfunctions, changes in mitochondrial DNA (including assessment of the significance of its haplogroup features), disorders in the dynamics of these organelles, oxidative damage to calcium channels, damage to MAM complexes (membranes associated with mitochondria; mitochondria-associated membranes), disruptions of the mitochondrial quality control system, mitochondrial permeability, etc. The issues of the "primary" or "secondary" mitochondrial damage in Alzheimer's disease are discussed. Potentials for the development of new methods for diagnosis and therapy of mitochondrial disorders in Alzheimer's disease are considered.

*Keywords:* Alzheimer's disease, stress-induced diseases, mitochondria, mitochondrial dysfunction

УДК 577.25

## ВЛИЯНИЕ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА НА МЕТАБОЛИЗМ БЕЛКА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА $\beta$ -АМИЛОИДА И ЭКСПРЕССИЮ АМИЛОИД-ДЕГРАДИРУЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ В КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС: РОЛЬ В ПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

© 2021 Е. Бабусикова<sup>1</sup>, Д. Доброта<sup>1</sup>, Э.Дж. Тернер<sup>2</sup>, Н.Н. Наливаева<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Университет Коменского в Братиславе, медицинский факультет Эссениуса в Мартине, отдел медицинской биохимии, 036 01 Мартин, Словакия

<sup>2</sup> Школа биомедицинских наук факультета биологических наук Университета Лидс, LS2 9JT Лидс, Великобритания

<sup>3</sup> Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: n.n.nalivaeva@leeds.ac.uk

Поступила в редакцию 08.02.2021

После доработки 20.04.2021

Принята к публикации 20.04.2021

Заболеваемость болезнью Альцгеймера (БА) значительно увеличивается из-за хронического стресса и ишемии мозга, которые с годами вызывают накопление токсичных видов амилоидного пептида и повреждение головного мозга. Изучено влияние глобальной 15-минутной ишемии и 120-минутной реперфузии на уровни экспрессии белка-предшественника  $\beta$ -амилоида (APP) и его процессинга в коре головного мозга (Сх) самцов крыс линии Wistar. Также проведена оценка уровней экспрессии амилоид-деградирующих ферментов: неприлизина (NEP), эндотелин-превращающего фермента-1 (ECE-1) и инсулин-деградирующего фермента (IDE), а также некоторых маркеров окислительного повреждения. Полученные нами результаты свидетельствуют, что уровень мРНК и белка APP в Сх значительно повышается после ишемического инсульта. Уровни растворимых фрагментов APP (особенно sAPP $\beta$ , продуцируемого  $\beta$ -секретазой (BACE1)), мРНК и белка BACE1 также были увеличены после ишемии. Через 120 мин реперфузии уровни белков APP и BACE1 в Сх возвращались к контрольным значениям. Уровни мРНК NEP и ECE-1 также были снижены после ишемии, что коррелировало со снижением содержания этих ферментов. Однако мы не наблюдали никаких изменений в содержании инсулин-деградирующего фермента. Маркеры окислительного повреждения (дитиозина и конъюгатов лизина с продуктами перекисного окисления липидов) также были повышены после ишемии. Полученные данные позволяют предположить, что ишемия смещает процессинг APP в сторону амилоидогенного  $\beta$ -секретазного пути и накопления нейротоксичного пептида А $\beta$ , а также запускает окислительный стресс в клетках. Данные результаты обсуждаются в контексте роли стресса и ишемии в инициации и прогрессировании БА.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** болезнь Альцгеймера, белок-предшественник  $\beta$ -амилоида,  $\beta$ -секретазы, эндотелин-превращающий фермент-1, глобальная ишемия головного мозга, инсулин-деградирующий фермент, неприлизин, стресс.

DOI: 10.31857/S0320972521060063

### ВВЕДЕНИЕ

Спорадическая или старческая форма болезни Альцгеймера (БА) – одно из самых тяжёлых неврологических расстройств людей пожилого возраста. Патопатология БА имеет сложный

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ПОЛ – перекисное окисление липидов; А $\beta$  –  $\beta$ -амилоидный пептид; APP – белок-предшественник амилоида; BACE1 –  $\beta$ -секретазы, Сх – кора головного мозга; ECE-1 – эндотелин-превращающий фермент-1; IDE – инсулин-деградирующий фермент; NEP – неприлизин.

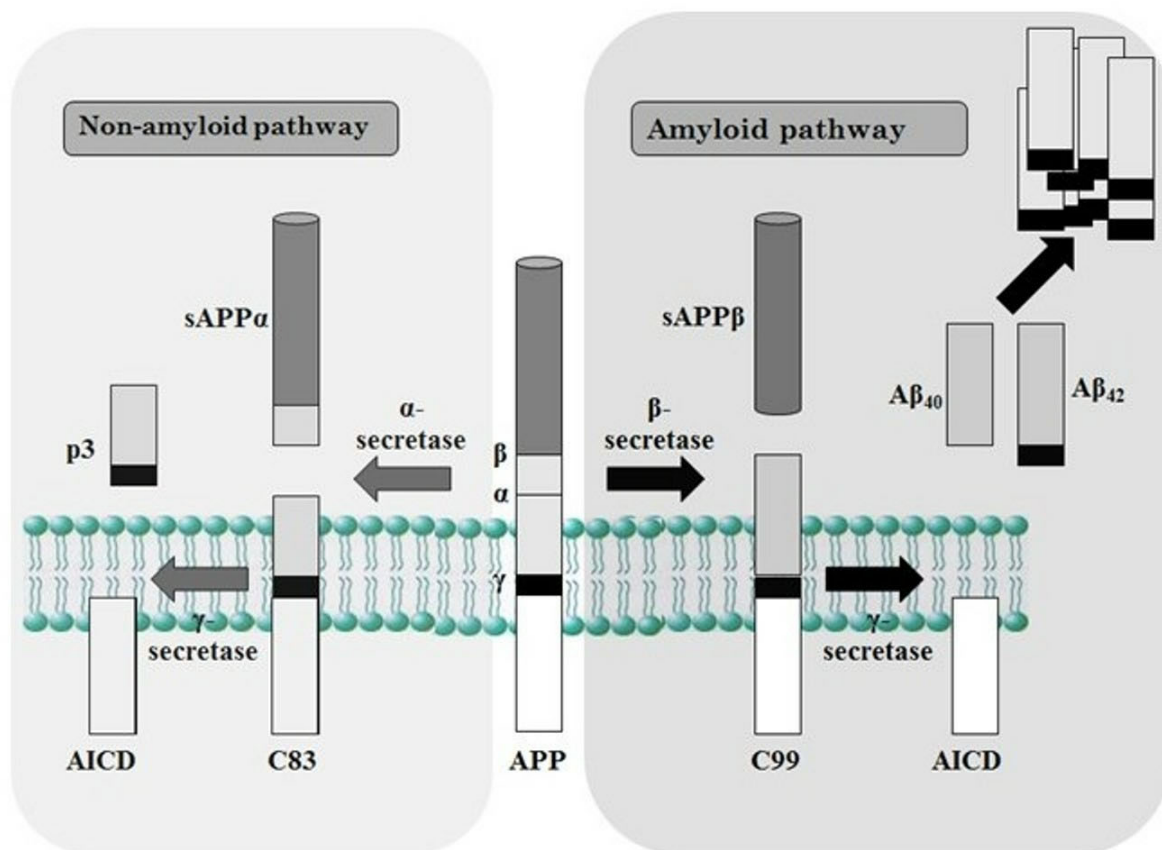
\* Адресат для корреспонденции.

многофакторный характер, и её основные причины все ещё плохо изучены. Однако накопленные клинические и экспериментальные данные позволяют полагать, что стресс на протяжении всей жизни играет важную роль в развитии БА [1, 2], увеличивая риск ишемии мозга и инсульта [3], что, в свою очередь, увеличивает частоту заболеваемости БА [4, 5]. Одной из основных причин возникновения нейродегенерации, вызванной ишемией, является повышенная экспрессия генов, связанных с патогенезом БА [6, 7]. Хронический стресс также может способствовать патогенезу БА, влияя на функ-

циональный статус глиальных клеток головного мозга и приводя к дефициту клиренса амилоида [8]. С другой стороны, раннее нарушение регуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси также часто встречается у пациентов с БА, что приводит к нарушению метаболизма глюкокортикоидов. Эти стероидные гормоны могут легко проникать в мозг и вызывать эксайтотоксичность в лимбических структурах (префронтальная кора и гиппокамп), которые поражаются на ранних стадиях БА [9–12].

Патология головного мозга при БА характеризуется образованием двух основных белковых кластеров: внеклеточных отложений  $\beta$ -амилоидного пептида ( $A\beta$ ) и внутриклеточных агрегатов гиперфосфорилированного тау, которые накапливаются в головном мозге пациентов с БА, особенно в гиппокампе, амигдале и

лобной коре [13]. Хотя гипотеза «амилоидного каскада» БА [14] подвергалась критике из-за неудач в разработке успешного лечения, основанного на её главных постулатах, она по-прежнему остаётся основным направлением исследований патологии БА [15]. Гипотеза «амилоидного каскада» предполагает, что образование  $A\beta$  из белка-предшественника  $\beta$ -амилоида (APP) является начальной стадией событий, ведущих при определённых патологических условиях к накоплению токсичных агрегатов  $A\beta$ , которые вызывают гибель нейрональных клеток и другие нейропатологические процессы в головном мозге [16–17]. Формирование сенильных бляшек, в которых  $A\beta$  часто находится в комплексе с другими белками, некоторые авторы рассматривают, как попытку удалить токсичные амилоидные формы из нейрональных клеток, хотя ги-



**Рис. 1.** Процессинг белка-предшественника  $\beta$ -амилоида (APP). Неамилоидогенный путь процессинга APP начинается с его расщепления  $\alpha$ -секретазой с образованием нейропротекторного растворимого N-концевого фрагмента sAPP $\alpha$  и мембраносвязанного фрагмента C83, который далее расщепляется комплексом  $\gamma$ -секретазы, продуцирующим небольшой пептид (p3) и внутриклеточный домен APP (AICD). Амилоидогенный путь начинается с расщепления APP  $\beta$ -секретазой с образованием нейропротекторного растворимого N-концевого фрагмента sAPP $\beta$  и мембраносвязанного фрагмента C99, который также расщепляется  $\gamma$ -секретазой, образуя  $A\beta$ -пептиды различной длины (в основном  $A\beta_{40}$ , но также более токсичный  $A\beta_{42}$ ) и AICD.  $A\beta$ -Пептиды образуют токсичные олигомеры, а затем сенильные бляшки, связываемые с патогенезом БА. (С цветными вариантами рисунков можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biohsm/>)



бель клеток наблюдается также и вблизи самих бляшек [18, 19].

Образование  $A\beta$  из APP происходит через амилоидогенный путь процессинга APP, инициируемый действием аспаргатной протеазы  $\beta$ -секретазы (BACE1), с расщеплением APP и высвобождением растворимого *N*-концевого фрагмента sAPP $\beta$  (рис. 1). Дальнейшее протеолитическое расщепление оставшегося мембраносвязанного *C*-концевого фрагмента APP (C99) с помощью  $\gamma$ -секретазы, представляющей собой большой мембранный белковый комплекс [20, 21], приводит к образованию  $A\beta$ -пептидов различной длины (в основном  $A\beta_{40}$ , но также и более токсичного  $A\beta_{42}$ ), а также *C*-концевого фрагмента APP (AICD), обладающего свойствами регуляции экспрессии генов [22, 23].

В неамилоидогенном пути, на который приходится ~90% процессинга APP [24], он сначала расщепляется  $\alpha$ -секретазой, продуцирующей растворимый *N*-концевой фрагмент sAPP $\alpha$  и мембраносвязанный концевой фрагмент C83 (рис. 1). В настоящее время общепринято, что металлопротеиназы семейства ADAM, в частности ADAM10, расщепляют APP по данному пути [25, 26]. Далее C83 также расщепляется комплексом  $\gamma$ -секретазы, высвобождая небольшой пептид p3 с неизвестными свойствами и AICD. Однако транскрипционно активным является только AICD, продуцируемый амилоидогенным  $\beta$ -секретазным путем [22]. Оба этих пути протекают в нормальных физиологических условиях, и все фрагменты APP, включая  $A\beta$ , выполняют важные физиологические функции [27, 28].

Метаболизм  $A\beta$  сложен, и сейчас хорошо известно, что он включает в себя различные протеолитические ферменты, среди которых основное место занимает металлопептидаза неприлизин (NEP), играющая основную роль в регуляции содержания  $A\beta$  в головном мозге [29]. Другими важными ферментами, расщепляющими  $A\beta$ , являются эндотелин-превращающий фермент-1 (ECE-1) и инсулин-деградирующий фермент (IDE). И NEP, и ECE-1 способствуют поддержанию стабильного уровня  $A\beta$ , предотвращая его накопление [30]. Различное клеточное и тканевое распределение в головном мозге ферментов, разрушающих амилоид, а также других транспортных белков, таких как транстиртин и ApoE, обеспечивает эффективную систему удаления  $A\beta$  из ткани мозга [31]. Однако эта система может ухудшаться либо с возрастом, либо из-за воздействия различных патологических состояний, приводящих к снижению эффективности её работы [32, 33], среди которых важную роль играют ишемия и хронический

стресс [34–36]. Также показано, что дефицит активности NEP увеличивает содержание амилоида в головном мозге [37], в то время как повышение его экспрессии приводит к уменьшению количества амилоидных бляшек в мозге трансгенных мышей, моделирующих БА [38], и улучшению когнитивных функций животных [39].

Активные формы кислорода (АФК) играют важную роль в нейродегенерации, вызванной недостатком кислорода в нервной ткани [40], а также токсичностью  $A\beta$  [41, 42]. В процессе старения в мозге наблюдается несколько различных видов окислительного повреждения белков и липидов, а также повышенное образование АФК [43]. В ткани головного мозга пациентов с БА наблюдается повышенный уровень маркёров окислительного стресса, включая окисленные белки, мембранные липиды и ДНК [44], окислительное повреждение которых непосредственно вовлечено в патогенез нейродегенеративных и невровакулярных заболеваний [45, 46].

АФК эффективны в очень малых концентрациях, а их период полураспада очень короткий. Наиболее важными мишенями окислительного повреждения являются липиды и аминокислотные остатки белков, и их реакции с АФК часто приводят к потере ферментативной, регуляторной, транспортной или структурной функций [47, 48]. Вызванное АФК повреждение ДНК, в том числе митохондриальной ДНК, приводит к развитию различных нейродегенеративных процессов [49], а также к раку [50]. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) также способствует развитию дисфункции ферментов и сигнальных молекул путём изменения состава мембран, а также путём образования реактивных альдегидов, способных связываться с белками [51].

В данном исследовании мы изучали влияние ишемии на экспрессию и метаболизм APP с помощью анализа уровней мРНК APP и общих уровней белков sAPP и sAPP $\beta$ , а также экспрессию BACE1 на уровнях мРНК и белка. Также был проведён анализ экспрессии амилоид-деградирующих ферментов NEP, ECE-1 и IDE на уровнях мРНК и белка, а также маркёров окислительного повреждения белков (дитиозина и конъюгатов лизина) в коре головного мозга (Cx) крыс после индуцированной *in vivo* ишемии и реперфузии.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** Крысы-самцы линии Wistar (масса 250–350 г, 6 мес.) были предоставлены Институтом экспериментальной фармакологии и

токсикологии Центра экспериментальной медицины Словацкой Академии Наук (IEPT SAS, Добра Вода, Словацкая Республика). Животным был предоставлен свободный доступ к пище и воде, и их содержали в кондиционируемой комнате с контролируемой температурой (18–22 °С) и 12-часовым циклом свет/темноты. Для обеспечения статистической значимости экспериментов использовали по 8 животных в каждой группе (ишемия, реперфузия, контроль). Все эксперименты были одобрены Этическим комитетом медицинского факультета им. Ессениуса в Мартине Университета им. Коменского в Братиславе. Все исследования проводили в соответствии с «Руководством по уходу и использованию лабораторных животных», опубликованным Национальным институтом здравоохранения США (публикация NIH № 85-23, пересмотренная в 1996 г.), рекомендациями ARRIVE [52], а также с правилами, установленными Государственной ветеринарной и пищевой администрацией Словацкой Республики. Были предприняты все усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных и уменьшить количество используемых животных.

**Моделирование ишемии.** Животные были разделены на три экспериментальные группы по 8 животных в каждой: контроль (ложно-оперированные), ишемия (15-мин ишемия) и реперфузия (15-мин ишемия с последующей 120-мин реперфузией). Ишемию переднего мозга вызывали методом окклюзии четырёх сосудов [53]. Вкратце, в первый день крыс подвергали хирургической подготовке под наркозом галотаном, и позвоночные артерии были полностью закупорены электрокоагуляцией. Затем были найдены сонные артерии, и вокруг них свободно размещены петли пластиковых трубок, чтобы обеспечить быстрое последующее обнаружение этих сосудов. На второй день сонные артерии были снова локализованы и перекрыты артериальными зажимами. Нормальный температурный режим тела во время ишемии поддерживался с помощью термического одеяла. Через 15 мин крыс декапитировали (группа животных с ишемией). Реперфузию инициировали удалением зажимов с сонных артерий после 15-мин ишемии. После периода рециркуляции (120 мин) крыс умерщвляли декапитацией (группа животных с реперфузией). В период реперфузии животных содержали в боксе со стабильной температурой. Животные контрольной группы были ложно-оперированы. Только одно животное в группе ишемии погибло после операции. Ни одно из выживших животных не было исключено из дальнейших экспериментов. Для биохими-

ческих анализов животных декапитировали под галотановым наркозом. Объединённую ткань коры обоих полушарий использовали для дальнейшего анализа, разделив после измельчения скальпелем на две части для последующего анализа мРНК с помощью ПЦР-РВ (ПЦР в реальном времени) и белков с помощью вестерн-блоттинга и флуоресцентной спектрометрии, как описано ниже. Всем животным и образцам головного мозга были присвоены номера, и экспериментаторы не знали об их групповом распределении, которое было раскрыто только в ходе статистического анализа данных.

**Подготовка образцов головного мозга.** Для получения фракции, содержащей растворимые белки, ткань Сх обоих полушарий гомогенизировали в гомогенизаторе стекло/стекло в 1 мл низкосолевого буфера (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), содержащего 10 mM MgCl<sub>2</sub> и 50 mM NaCl), а затем гомогенизатор снова промывали 1 мл того же буфера с коктейлем ингибиторов протеаз («Roche Diagnostics», Германия), и объединённый гомогенат центрифугировали при 100 000 g в течение 10 мин. Супернатант собирали и рассматривали как низкосолевою растворимую цитозольную фракцию. Осадок ресуспендировали в 1 + 1 мл 10 mM фосфатного буфера (pH 7,4), содержащего 1% (w/v) Triton X-100, инкубировали на льду в течение 1 ч и центрифугировали в течение 10 мин, как указано выше, для получения растворимой в детергенте (мембранной) фракции.

**Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE), вестерн-блоттинг, иммунодетекция.** Образцы, содержащие равные количества белка (45 или 90 мкг в зависимости от содержания предварительно оцененных белков), разделяли на 8%-ном SDS-PAGE и переносили на поливинилиден-флуоридную (PVDF) мембрану (Amersham Hybond-P, «GE Healthcare», Великобритания). Мембраны обрабатывали в течение ночи соответствующими первичными антителами: для обнаружения APP и общего sAPP – мышинными моноклональными антителами 22C11 («Roche Molecular Biochemicals», Германия), 1/4000; для sAPP $\beta$  – мышинными моноклональными антителами G26 («GlaxoSmithKline», Великобритания), 1/200; для BACE1 – мышинными моноклональными антителами 9B21 («GlaxoSmithKline», Великобритания), 1/2000; для NEP – кроличьими поликлональными антителами против НЕП крысы («US Biological», США), 1/100; для ESE-1 – мышинными моноклональными антителами Mab 32 (AEC32-236) (получены в дар от доктора К. Танзавы, Токио, Япония), 1/200; для IDE – мышинными моноклональными анти-

телами MMS-282R («Covance», Великобритания), 1/200; для  $\beta$ -актина – кроличьи антитела Actin (20-33) («Sigma Aldrich», США). После инкубации с первичными антителами мембраны промывали 4 раза по 15 мин в TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7,6, содержащий 0,1% Tween 20 (v/v)) с последующей инкубацией в течение 1 ч со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена – HRP кроличьими анти-крысиными или анти-мышинными антителами («Amersham Biosciences»), 1/2000. Затем мембраны промывали 4 раза по 15 мин в TBS pH 7,6, содержащем 0,1% Tween 20 (v/v); детекцию проводили с помощью системы обнаружения хемилюминесценции ECL – «Pierce ECL western blotting substrate» («ThermoFisher Scientific», Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя, визуализацию проводили на фотоплёнке Kodak. За загрузкой образца следили либо по актину (анти-актин 1/2000), либо по окрашиванию PVDF-мембран 0,1%-ным «Ponceau S» («Sigma Aldrich») в 5%-ной уксусной кислоте (v/v). Количественное определение полос проводили с помощью хемилюминесцентной сканирующей денситометрии с использованием системы ChemiDoc SRS+ и программного обеспечения «Bio-Rad Multi-Analyst™/PC», версия 1.1.1 («Bio-Rad», Великобритания).

**ПЦР в реальном времени.** Ткани Сх выдерживали в соответствующем объёме реагента для стабилизации РНК («RNAlater», «Qiagen», Великобритания) в соответствии с инструкциями производителя при 4 °С до выделения РНК. РНК выделяли с помощью набора «RNeasy Lipid Tissue» («Qiagen») в соответствии с протоколом производителя. кДНК получали с использованием набора «iScript cDNA kit» («Bio-Rad») и общепринятой полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР в реальном времени выполняли в термоциклере PTC-200 Peltier Thermal

Cycler («MJ Research», США) с многоцветной системой детектирования ПЦР с использованием «SensiMix™ SYBR & Fluorescein Kit» («Bioline», Великобритания), и выражали экспрессию генов интереса относительно мРНК актина. Все образцы анализировали многократно. Список праймеров приведён в табл. 1.

**Анализ дитирозина и конъюгатов лизина.** Анализы дитирозина и конъюгатов лизина с продуктами ПОЛ проводили при 25 °С с использованием спектрофлуориметра «Shimadzu RF 540» («Shimadzu Corporation», Япония), как описано ранее [54]. Для измерений флуоресценции аликвоты мембранной фракции, содержащие 50 мкг общего белка, разбавляли в 1 мл буфера (10 mM HEPES, 100 mM KCl, pH 7,0). Спектры излучения дитирозина, продукта окисления тирозина, регистрировали в диапазоне длин волн 380–440 нм (ширина щели 5 нм) при  $\lambda_{ex}$  (длина волны возбуждения) 325 нм. Спектры излучения конъюгатов лизина с продуктами ПОЛ регистрировали в диапазоне длин волн 425–480 нм при  $\lambda_{ex}$  365 нм (ширина щели 5 нм). Результаты представлены в виде средних значений  $\pm$  стандартная ошибка среднего для интенсивности флуоресценции, выраженной в условных единицах.

**Концентрацию белка** в образцах измеряли с помощью бицинхонинового метода (BCA) [55], модифицированного для 96-луночных микротитровальных планшетов. Рабочий реагент готовили путём смешивания раствора бицинхониновой кислоты (B9643, «Sigma-Aldrich») с 4%-ным (w/v)  $CuSO_4$  в соотношении 50/1. Образцы (10 мкл) вносили в лунки планшетов, в каждую лунку добавляли 200 мкл реагента BCA/ $CuSO_4$  и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин, после чего определяли поглощение при длине волны 570 нм на мультидетекторном микропланшете-ридере «FLUOstar Omega multi-detection microplate reader» («BMG Labtech», Великобритания). В лунках для проб сравнения

Таблица 1. Праймеры, используемые для ПЦР-РВ

МРНК	Последовательность праймеров (5'–3')	
	Прямой	Обратный
APP	GGCCCTCGAGAATTACATCA	GTCATGCGCTCGTAGATCA
BACE-1	GCATGATCATTTGGTGGTATC	CCATCTTGAGATCTTCACCA
NEP	GGAAGCCATTCAGCTGGT	TGGAGCATAAACAACCATTCT
ECE-1	GGACTTCTTCAGCTACGCCTGT	CTAGTTTCGTTTCATACACGCACG
$\beta$ -актин	GCTACAGCTTCACCACCACA	GCCATCTCTTGCTCGAAGTC

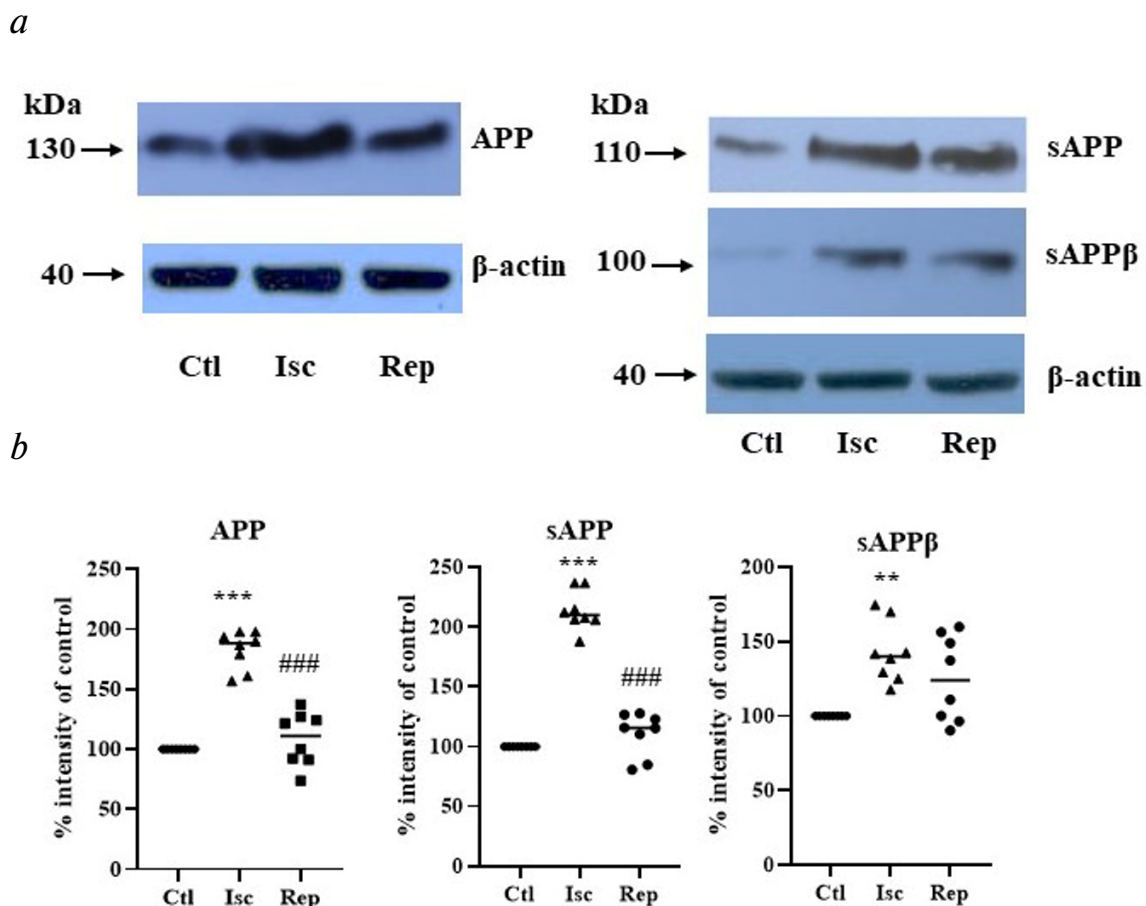
содержалось 10 мкл воды или 10 мкл различных разведений бычьего сывороточного альбумина (P0914, «Sigma Aldrich»), который использовали в качестве стандарта.

**Статистический анализ.** Статистический анализ данных выполняли с использованием программного обеспечения «GraphPad Prism 9.1.0». Оценку минимального размера группы проводили по методу Салливана на основе предварительных экспериментов. Нормальность распределения анализировали с использованием критерия Колмогорова–Смирнова, при этом все данные проходили тест на нормальность. Сравнение экспериментальной и контрольной групп проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюки. Все данные представлены как среднее значение  $\pm$  SEM (стандартная ошибка среднего). Статистически значимым считалось значение при  $p < 0,05$ .

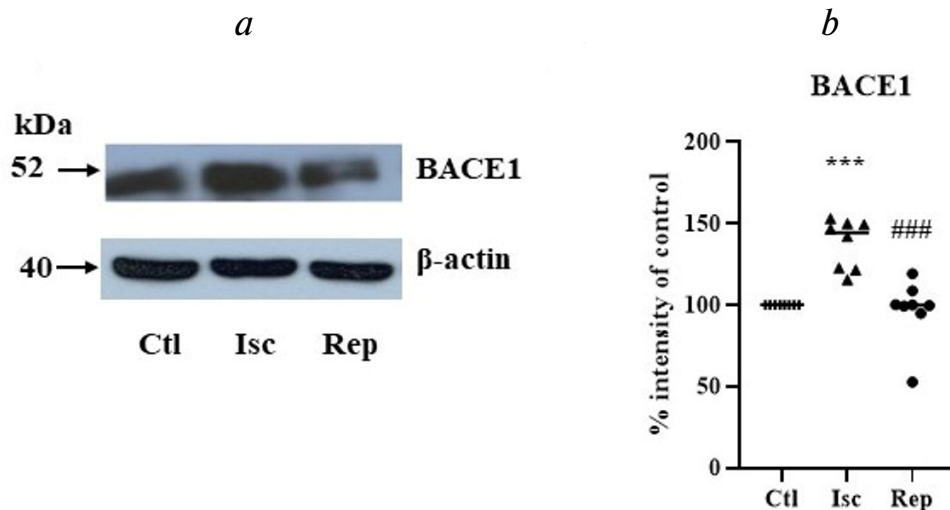
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Влияние ишемии и реперфузии на уровни мРНК и белка APP.** Вызванная *in vivo* 15-мин глобальная ишемия приводила к увеличению экспрессии мРНК APP в Сх крыс на  $22,26 \pm 8,52\%$  ( $F_{2,21} = 6,22$ ;  $p = 0,0076$ ) по сравнению с экспрессией у ложно-оперированных животных, принятой за 100% (табл. 2). После 120 мин реперфузии содержание мРНК APP возвращалось к контрольным значениям ( $97,80 \pm 3,96\%$ ), зарегистрированным для ложно-оперированных животных.

Уровни белка APP анализировали как в растворимой (цитозольной), так и в мембранной фракциях Сх (рис. 2). В мембранной фракции уровень мембраносвязанного APP после глобальной ишемии увеличился до  $182,83 \pm 5,66\%$  ( $F_{2,21} = 66,97$ ;  $p < 0,0001$ ), тогда как после 120 мин реперфузии он составил только



**Рис. 2.** Влияние ишемии на уровни APP и sAPP в коре головного мозга крысы. *a* – Репрезентативный вестерн-блот. *b* – Количественный анализ уровней белка APP, sAPP и sAPPβ в % от контроля (принят за 100%). Условные обозначения: Ctl – контроль; Isc – 15-мин ишемия; Rep – 15-мин ишемия с последующей 120-мин реперфузией. Результаты выражены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 8$ ). \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с контролем. ###  $p < 0,001$  по сравнению с ишемией



**Рис. 3.** Уровни белка BACE1 в коре головного мозга крысы после ишемии. *a* – Репрезентативный вестерн-блот. *b* – Количественный анализ уровня белка BACE1 в % от контроля (принят за 100%). Условные обозначения: Ctl – контроль; Isc – 15-мин ишемия; Rep – 15-мин ишемия с последующей 120-мин реперфузией. Результаты выражены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 8$ ). \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с контролем; ###  $p < 0,001$  по сравнению с ишемией

$108,49 \pm 7,81\%$  ( $p < 0,001$ ) от уровня ложно-оперированных животных (рис. 2, *a* и *b*). Уровень общего sAPP в растворимой фракции после глобальной ишемии увеличился до  $213,69 \pm 5,79\%$  ( $F_{2,21} = 158,0$ ;  $p < 0,0001$ ). После реперфузии уровень sAPP был все ещё выше, чем у ложно-оперированных животных (приблизительно на 10%), но это не было статистически значимым. Количество sAPP $\beta$  (продукта расщепления APP по  $\beta$ -секретазному пути) также было значительно выше после глобальной ишемии и достигало  $142,37 \pm 7,21\%$  ( $F_{2,21} = 8,82$ ;  $p = 0,0017$ ). Хотя после реперфузии уровни sAPP $\beta$  оставались довольно высокими по сравнению с ложно-оперированными животными, это не было статистически достоверным.

**Влияние ишемии и реперфузии на уровни мРНК и белка BACE1.** Поскольку в Сх ишемизированного мозга мы наблюдали повышенные уровни sAPP $\beta$ , мы также предприняли анализ экспрессии  $\beta$ -секретазы (BACE1), которая отвечает за амилоидогенный процессинг APP. Уровни мРНК и белка BACE1 были увеличены после глобальной ишемии, но снижались до контрольных уровней после реперфузии. Так, уровень мРНК BACE1 в Сх после ишемии был выше на  $34,02 \pm 10,86\%$  ( $F_{2,21} = 5,86$ ;  $p = 0,0095$ ) (табл. 2), а на уровне белка – на  $37,61 \pm 3,34\%$  ( $F_{2,21} = 20,45$ ;  $p < 0,001$ ) (рис. 3), в то время как статистически значимых различий после реперфузии по сравнению с ложно-оперированными животными зарегистрировано не было.

**Ишемия снижает уровни мРНК и белка амилоид-деградирующих ферментов.** ПЦР-анализ

уровней мРНК NEP и ECE-1 в Сх показал, что экспрессия обоих ферментов снижалась после ишемии (табл. 3). В Сх экспрессия NEP была ниже на  $22,14 \pm 7,54\%$  ( $F_{2,21} = 3,86$ ;  $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. После реперфузии уровни мРНК NEP возвращались к контрольным значениям. Мы также наблюдали значительное снижение на  $24,98 \pm 5,71\%$  ( $F_{2,21} = 5,22$ ;  $p = 0,014$ ) уровней мРНК ECE-1 в Сх, которые возвращались к контрольным значениям после реперфузии.

Данные вестерн-блоттинга показали, что ишемия также приводит к снижению уровней белков NEP и ECE-1 (рис. 4). Уровни NEP снижались на  $38,11 \pm 5,29\%$  ( $F_{2,21} = 21,33$ ;  $p < 0,001$ ) после 15-мин глобальной ишемии по сравнению с ложно-оперированными контрольными животными, в то время как после 120 мин реперфузии они существенно не отличались от

**Таблица 2.** Уровни мРНК APP и BACE1 в коре головного мозга крыс после ишемии и реперфузии

Статус	APP	BACE1
Контроль	100	100
Ишемия	$122,26 \pm 8,52^*$	$134,02 \pm 10,86^*$
Реперфузия	$97,80 \pm 3,96^{##}$	$100,85 \pm 8,63^{##}$

Примечание. Результаты рассчитывали в % от значений контроля (ложно-оперированные животные), взятых за 100%, и выражали в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 8$ ). \*  $p < 0,01$  по сравнению с контролем; ##  $p < 0,01$  по сравнению с ишемией.

контроля. Уровни ЕСЕ-1 снижались на  $47,32 \pm 4,85\%$  ( $F_{2,21} = 51,96; p < 0,001$ ) после ишемии, но были выше на  $24,65 \pm 7,33\%$  после реперфузии по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,01$ ). Вестерн-блоттинг также показал отсутствие изменений в уровнях белка IDE как после ишемии ( $F_{2,21} = 1,53; p = 0,24$ ), так и после реперфузии.

**Маркёры окислительного повреждения.** Накопление продуктов перекисного окисления липидов и белков, которые мы проанализировали в мембранной фракции Сх, позволили предположить, что ишемия приводит к значительному окислительному повреждению ткани. Так, уровень интенсивности флуоресценции дитиозина увеличивался после ишемии на  $32,15 \pm 10,92\%$  ( $F_{2,21} = 18,85; p < 0,0001$ ) по сравнению с контролем (табл. 4), но снижался до контрольных величин после реперфузии. Чтобы оценить модификации белков конечными продуктами перекисного окисления липидов, мы измерили спектры флуоресценции, соответствующие конъюгатам конечных продуктов ПОЛ со свободными аминокеттогруппами белков. В табл. 4 приведены результаты изменения интенсивности флуоресценции в спектре излучения конъюгатов лизина после

ишемии и реперфузии, которая увеличилась на  $36,33 \pm 6,23\%$  ( $F_{2,21} = 21,8; p < 0,0001$ ) соответственно по сравнению с ложно-оперированными животными, но вернулась к контрольному уровню после реперфузии.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хотя влияние различных типов ишемии на метаболизм амилоидного пептида было изучено на различных моделях [56–58], наше исследование впервые продемонстрировало, что острая глобальная ишемия влияет одновременно на различные пути метаболизма амилоидного пептида в ткани коры мозга крыс, включая экспрессию APP на уровне мРНК и белка, его процессинг с помощью амилоидогенной  $\beta$ -секретазы (BACE1) и экспрессию белкового продукта BACE1, а также на уровне экспрессии ферментов, участвующих в деградации А $\beta$ . Данные, накопленные в этом исследовании, ясно продемонстрировали, что даже после 15-мин глобальной ишемии происходит значительный сдвиг в сторону процессов, ведущих к продукции и накоплению А $\beta$  из-за повышенной экспрессии APP и BACE1 (как на уровне мРНК, так и на уровне белка), образования sAPP $\beta$ , а также из-за снижения экспрессии амилоид-деградирующих ферментов NEP и ЕСЕ-1. Полученные результаты объясняют, почему различные авторы сообщают о повышенных уровнях А $\beta$  и накоплении сенильных бляшек в ишемизированном мозге у трансгенных мышей, моделирующих БА [59, 60], или в мозге человека [61, 62]. Поскольку крысы дикого типа не накапливают амилоидные отложения из-за различий в аминокислотной последовательности APP в домене А $\beta$  по сравнению с APP человека [63], большая часть исследований метаболизма амилоида проводится на трансгенных животных. Тем не менее весь механизм процессинга APP и деградации амилоида у крыс имеет те же основные компоненты, что и в человеческом мозге, поэтому данные исследований на крысах можно экстраполировать на основную биохимию человеческого мозга.

В нашем исследовании повышение уровней мРНК APP после 15-мин глобальной ишемии коррелировало с увеличением уровней белка APP как в мембранной, так и в растворимой фракции Сх крысы, что согласуется с ранее полученными нами данными для всего полушария мозга [64]. Также имеются данные об ускоренной продукции С- и N-концевых фрагментов sAPP в перинфарктной зоне головного мозга крыс после очаговой церебральной ишемии [65]. В то время как количество общих сек-

**Таблица 3.** Уровни мРНК амилоид-деградирующих ферментов в коре головного мозга крыс после ишемии и реперфузии

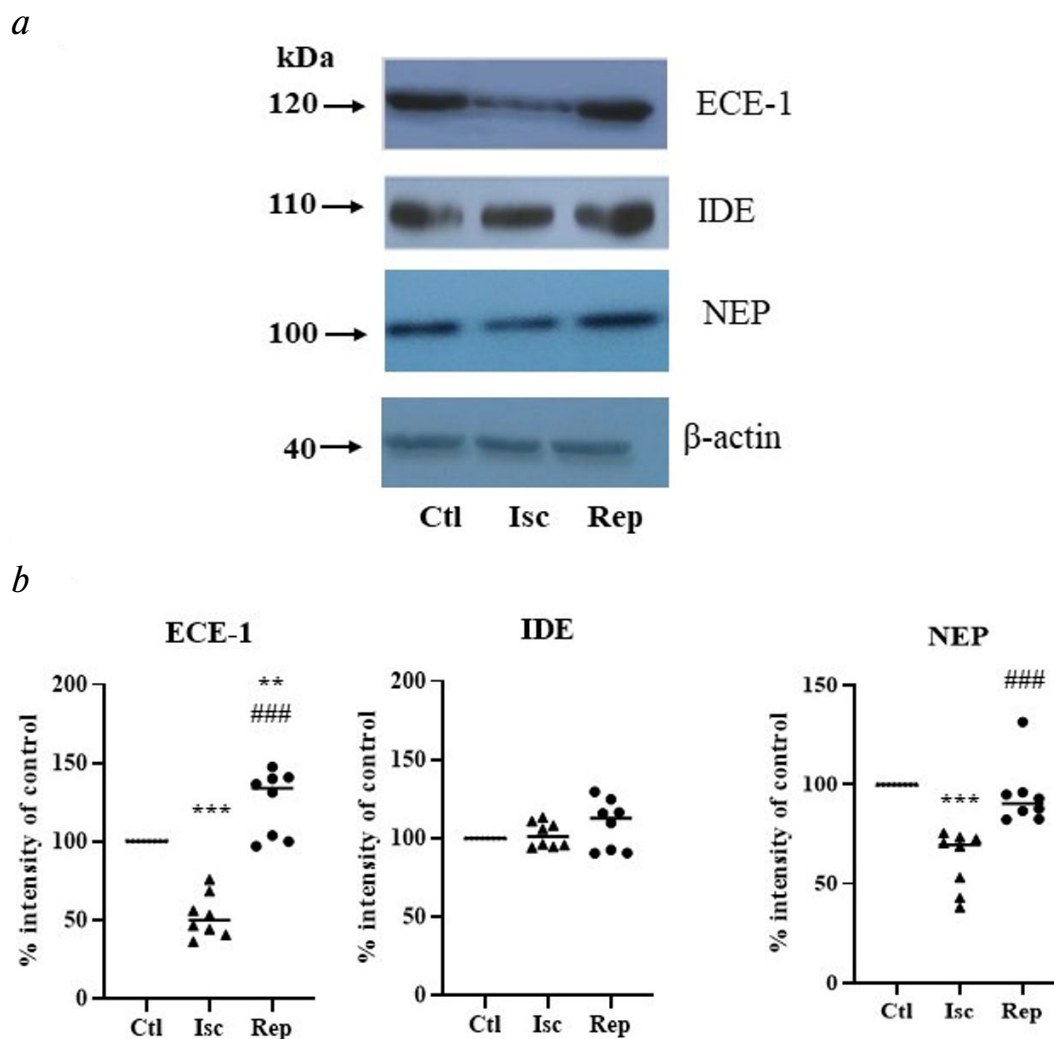
Статус	NEP	ЕСЕ-1
Контроль	100	100
Ишемия	$77,86 \pm 7,54^*$	$75,02 \pm 5,71^{**}$
Реперфузия	$95,19 \pm 8,22$	$101,26 \pm 9,65^{\#}$

Примечание. Результаты рассчитывали в % от значений контроля (ложно-оперированные животные), взятых за 100%, и выражали как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 8$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  по сравнению с контролем;  $\# p < 0,05$  по сравнению с ишемией.

**Таблица 4.** Влияние ишемии и реперфузии на интенсивность флуоресценции (условные единицы) маркёров окислительного повреждения во фракции мембран коры мозга крыс

Статус	Дитиозин	Конъюгаты лизина
Контроль	$67,89 \pm 2,58$	$61,57 \pm 3,32$
Ишемия	$87,88 \pm 2,61^{***}$	$83,56 \pm 1,46^{***}$
Реперфузия	$69,09 \pm 2,69^{###}$	$61,68 \pm 2,99^{###}$

Примечание. Результаты выражены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 8$ ). \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с контролем; ###  $p < 0,001$  по сравнению с ишемией.



**Рис. 4.** Уровни белка амилоид-деградирующих ферментов в мембранной фракции коры головного мозга крысы после ишемии. *a* – Репрезентативный вестерн-блот. *b* – Количественный анализ уровней белков ECE-1, IDE и NEP в % от контроля (принят за 100%). Условные обозначения: Ctl – контроль; Isc – 15-мин ишемия; Rep – 15-мин ишемия с последующей 120-мин реперфузией. Результаты выражены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $n = 8$ ). \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с контролем; ###  $p < 0,001$  по сравнению с ишемией

ретируемых продуктов APP, наблюдаемых нами в Сх после глобальной ишемии, было увеличено на 113% по сравнению с контролем, количество sAPP $\beta$  увеличилось на 42%, это позволяет сделать предположение о том, что другая часть секретируемых продуктов была образована при действии на APP  $\alpha$ -секретазы. Действительно, имеются данные, что хроническая ишемия головного мозга вызывает активацию металлопептидаз семейства ADAM, особенно ADAM10 и ADAM17 [66].

Увеличение продукции sAPP $\beta$  после 15-мин глобальной ишемии также коррелировало с повышенной экспрессией и уровнями белка BACE1, который инициирует амилоидогенный процессинг APP. Хотя это и не является

статистически значимым, уровни sAPP $\beta$  были все же выше после 120-мин реперфузии, в то время как общий sAPP практически снижался до уровней ложно-оперированных животных. Также ранее нами была показана повышенная иммунореактивность sAPP $\beta$  и BACE1 в гиппокампе крыс после глобальной ишемии, что позволяет сделать предположение о том, что амилоидогенный процессинг APP увеличивается в различных структурах мозга. Стоит отметить, что увеличение уровней sAPP $\beta$  в гиппокампе было намного выше, чем мы наблюдали в данном исследовании в Сх, несмотря на то что в гиппокампе не было обнаружено значительного увеличения уровней белка BACE1 [67]. После ишемии в коре средней височной доли крыс были

зарегистрированы повышенные уровни мРНК BACE1 даже через 2 дня после глобальной ишемии [68]. Увеличение выработки sAPP $\beta$  предполагает, что после ишемии клетки в Сх имеют больше субстрата для расщепления  $\gamma$ -секретазой и продукции A $\beta$ . Более того, есть сообщения о том, что ишемия увеличивает экспрессию основных белков комплекса  $\gamma$ -секретазы, PS1 и PS2, в гиппокампе крыс даже через 2 дня после временной 10-мин глобальной ишемии, вызванной остановкой сердца у крыс [69]. В совокупности эти данные позволяют сделать вывод, что ишемия неизбежно приводит к условиям, благоприятствующим образованию избыточного количества пептида A $\beta$  в Сх мозга. Хотя в нашем исследовании мы наблюдали, что после 120-мин реперфузии экспрессия APP и BACE1 практически возвращалась к контрольным значениям, есть данные, что после ишемии их экспрессия может увеличиваться на более поздних стадиях восстановления, что предрасполагает к продолжительной выработке A $\beta$  [68, 69] с более выраженным эффектом у старых животных [70].

Помимо потенциации образования A $\beta$ , ишемия определенно влияет на ферменты, участвующие в его деградации. Как мы показали в данном исследовании, экспрессия мРНК и уровни белка двух основных ферментов, расщепляющих амилоид, NEP и ECE-1, значительно снижаются после 15-мин глобальной ишемии. Помимо того, что NEP является ферментом, разлагающим A $\beta$ , он также является важной нейропептидазой, участвующей в прекращении пептидергической нейротрансмиссии таких важных нейропептидов, как соматостатин, энкефалины, вещество P и т.д., и снижение уровня NEP приведет к нарушению всех процессов в головном мозге, которые требуют его активности [71]. С другой стороны, есть сообщения о том, что предварительное введение мышам комбинированного препарата LCZ696 (блокатор рецепторов ангиотензина/ингибитор NEP) предотвращает повреждение мозга, вызванное окклюзией средней мозговой артерии, за счёт снижения уровней супероксидного аниона на ишемической стороне коры [72]. Хотя NEP также играет очень важную роль в регулировании артериального давления, и его ингибиторы в сочетании с блокаторами рецепторов ангиотензина предотвращают сердечную недостаточность [73], нельзя недооценивать возможность негативного влияния пониженной экспрессии NEP в головном мозге на содержание A $\beta$ . Действительно, есть существенные доказательства того, что дефицит экспрессии NEP или ингибирование его активности увеличивает накопление A $\beta$  в головном

мозге различных видов животных, включая приматов [37, 74, 75].

Поскольку экспрессия NEP в нейрональных клетках повышается при участии AICD через  $\beta$ -секретазный путь расщепления APP [22, 76], было возможным ожидать, что после ишемии экспрессия NEP будет увеличиваться при активации процессинга APP с помощью BACE1, которую мы обнаружили в данном исследовании. Однако после глобальной ишемии мы не наблюдали увеличения уровня мРНК NEP, а напротив, значительное его снижение в Сх крыс. Основной причиной этого может быть повышенная экспрессия каспаз в условиях ишемии, которые разрушают AICD, а также высокие уровни IDE, который также расщепляет AICD [77]. Активация каспаз в условиях ишемии довольно хорошо изучена [78]. В наших исследованиях мы также наблюдали повышенную экспрессию каспаз, сопровождаемую снижением уровней AICD и NEP в Сх головного мозга крыс после пренатальной гипоксии, которая восстанавливалась после инъекции ингибитора каспаз Ac-DEVD-CHO [79]. Поскольку настоящее исследование не выявило каких-либо изменений уровней мРНК и белка IDE после глобальной ишемии, можно предположить, что IDE может легко расщеплять AICD в Сх крыс, предотвращая повышение экспрессии NEP.

Уменьшение экспрессии ECE-1, помимо сниженного расщепления амилоида- $\beta$ , также может оказывать повреждающее действие на мозг, поскольку, как было показано, его субстрат, эндотелин-1, усугубляет ишемическореферфузионное повреждение в неокортексе крыс [80]. Более того, имеются данные, что полиморфизм в гене *ECE-1b* увеличивает риск ишемического инсульта [81]. Поскольку число исследований экспрессии ECE-1 после ишемии весьма ограничено, наши данные добавляют новую информацию к общим знаниям об этой важной металлопептидазе.

Окислительный стресс, который всегда сопровождает ишемию и реперфузию, заметно усиливает их патогенное действие на мозг [82]. Как мы показали в данном исследовании, 15-мин глобальная ишемия приводит к значительному увеличению модификаций белков на уровне дитиозина и конъюгатов лизина в Сх крыс, что коррелирует с данными, полученными ранее, о повышенных уровнях модификаций липидов и белков в переднем мозге крыс [83]. Есть также данные о том, что окислительный стресс влияет на экспрессию и активность NEP [34]. Окислительное повреждение липидов и белков также является потенциальной основной причиной гиперпродукции A $\beta$  при ишемии и гибели ней-



рональных клеток [5], что представляет собой порочный круг в патогенных процессах, вызываемых ишемией. Повышенные уровни окисленных белков и липидов могут быть результатом не только увеличения производства АФК и их реактивности во время ишемического инсульта, но также и следствием снижения способности организма защищаться от окислительных повреждений, вызванных ослаблением системы антиоксидантной защиты, что также является одним из основных механизмов патологии БА и мишенью для нейропротекции [84]. Лечение антиоксидантами может ослабить негативные эффекты ишемии у пациентов и может быть полезным для предотвращения связанного с ишемией накопления Аβ за счёт увеличения уровней и активности белка NER, как показано на животных после пренатальной гипоксии [85].

Данные, полученные в этом исследовании, предполагают, что даже 15-мин глобальная ишемия значительно влияет на белки, которые являются основными участниками метаболизма Аβ. Тот факт, что после относительно короткой (120 мин) реперфузии их экспрессия практически возвращается к контрольным уровням, предполагает, что мозг имеет способность восстанавливать свой нормальный гомеостаз даже после глобального эпизода ишемии. Однако в долгосрочной перспективе эпизоды ишемии и реоксигенации могут приводить к более серьезным нарушениям, наблюдаемым на различных уровнях метаболизма амилоида [57, 58, 68, 74]. Поэтому хронический стресс, который часто приводит к нарушению мозгового кровообращения и ишемическим состояниям в головном мозге, может

выступать фактором, предрасполагающим к нейродегенеративным процессам, а в более тяжёлых случаях – к БА [3, 6, 12].

Поскольку патологические изменения в головном мозге, приводящие к БА, на протяжении многих лет имеют кумулятивный эффект, не следует недооценивать роль хронического стресса, депрессии, гипоперфузии мозга и ишемии. Нельзя ожидать создание одного магического лекарства, которое бы предотвращало или полностью излечивало нейродегенеративные процессы в головном мозге. Только комплексный терапевтический подход, направленный на различные аспекты метаболизма амилоида, может привести к разработке стратегии, позволяющей отсрочить начало заболевания и минимизировать его тяжесть.

**Финансирование.** Работа поддержана грантами FP7-PEOPLE-2010-IEF, MRC, ARUK, VEGA 1/0266/18, а также частично Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 19-015-00232) и Госзаданием АААА-А18-118012290373-7.

**Благодарности.** Благодарим Я. Бенкатова, З. Цетлова и А. Кемпна за лабораторную помощь.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Эта статья не содержит исследований с участием людей. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с руководящими принципами ARRIVE по проведению исследований на животных и отчетности по ним.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Escher, C. M., Sannemann, L., and Jessen, F. (2019) Stress and Alzheimer's disease, *J. Neural. Transm (Vienna)*, **126**, 1155-1161, doi: 10.1007/s00702-019-01988-z.
2. Sotiropoulos, I., Silva, J. M., Gomes, P., Sousa, N., and Almeida, O. F. X. (2019) Stress and the etiopathogenesis of Alzheimer's disease and depression, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1184**, 241-257, doi: 10.1007/978-981-32-9358-8\_20.
3. Kotłęga, D., Gołąb-Janowska, M., Masztalewicz, M., Cieciewicz, S., and Nowacki, P. (2016) The emotional stress and risk of ischemic stroke, *Neurol. Neurochir. Pol.*, **50**, 265-270.
4. Daulatzai, M. A. (2017) Cerebral hypoperfusion and glucose hypometabolism: key pathophysiological modulators promote neurodegeneration, cognitive impairment, and Alzheimer's disease, *J. Neurosci. Res.*, **95**, 943-972, doi: 10.1002/jnr.23777.
5. Dong, S., Maniar, S., Manole, M. D., and Sun, D. (2018) Cerebral hypoperfusion and other shared brain pathologies in ischemic stroke and Alzheimer's disease, *Transl. Stroke Res.*, **9**, 238-250, doi: 10.1007/s12975-017-0570-2.
6. Ułamek-Kozioł, M., Pluta, R., Januszewski, S., Kocki, J., Bogucka-Kocka, A., and Czuczwar, S. J. (2016) Expression of Alzheimer's disease risk genes in ischemic brain degeneration, *Pharmacol. Rep.*, **68**, 1345-1349, doi: 10.1016/j.pharep.2016.09.006.
7. Pluta, R., Ułamek-Kozioł, M., Januszewski, S., and Czuczwar, S. J. (2020) shared genomic and proteomic contribution of amyloid and tau protein characteristic of Alzheimer's disease to brain ischemia, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 3186, doi: 10.3390/ijms21093186.
8. Bisht, K., Sharma, K., and Tremblay, M. È. (2018) Chronic stress as a risk factor for Alzheimer's disease: roles of microglia-mediated synaptic remodeling, inflammation, and oxidative stress, *Neurobiol. Stress*, **9**, 9-21, doi: 10.1016/j.ynstr.2018.05.003.
9. Canet, G., Hernandez, C., Zussy, C., Chevallier, N., Desrumaux, C., and Givalois, L. (2019) Is AD a stress-related disorder? Focus on the HPA axis and its promising therapeutic targets, *Front. Aging Neurosci.*, **11**, 269, doi: 10.3389/fnagi.2019.00269.
10. Gulyaeva, N. V. (2019) Functional neurochemistry of the ventral and dorsal hippocampus: stress, depression, dementia and remote hippocampal damage, *Neurochem. Res.*, **44**, 1306-1322, doi: 10.1007/s11064-018-2662-0.
11. Podgorny, O. V., and Gulyaeva, N. V. (2020) Glucocorticoid-mediated mechanisms of hippocampal

- damage: contribution of subgranular neurogenesis, *J. Neurochem.*, doi: 10.1111/jnc.15265.
12. Gulyaeva, N. V. (2019) Biochemical mechanisms and translational relevance of hippocampal vulnerability to distant focal brain injury: the price of stress response, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1306-1328, doi: 10.1134/S0006297919110087.
  13. Ballard, C., Gauthier, S., Corbett, A., Brayne, C., Aarsland, D., and Jones, E. (2011) Alzheimer's disease, *Lancet*, **377**, 1019-1031, doi: 10.1016/S0140-6736(10)61349-9.
  14. Hardy, J., and Selkoe, D. J. (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics, *Science*, **297**, 353-356, doi: 10.1126/science.1072994.
  15. Walton, C. C., Begelman, D., Nguyen, W., and Andersen, J. K. (2020) Senescence as an amyloid cascade: the amyloid senescence hypothesis, *Front. Cell. Neurosci.*, **14**, 129, doi: 10.3389/fncel.2020.00129.
  16. Walsh, D. M., Hartley, D. M., Condron, M. M., Selkoe, D. J., and Teplow, D. B. (2001) *In vitro* studies of amyloid beta-protein fibril assembly and toxicity provide clues to the aetiology of Flemish variant (A692→Gly) Alzheimer's disease, *Biochem. J.*, **355**, 869-877, doi: 10.1042/bj3550869.
  17. Ferreira, S. T., Lourenco, M. V., Oliveira, M. M., and De Felice, F. G. (2015) Soluble amyloid-beta oligomers as synaptotoxins leading to cognitive impairment in Alzheimer's disease, *Front. Cell. Neurosci.*, **9**, 191, doi: 10.3389/fncel.2015.00191.
  18. Kobayashi, K., Hayashi, M., Nakano, H., Shimazaki, M., Sugimori, K., and Koshino, Y. (2004) Correlation between astrocyte apoptosis and Alzheimer changes in gray matter lesions in Alzheimer's disease, *J. Alzheimers Dis.*, **6**, 623-632, doi: 10.3233/jad-2004-6606.
  19. Kuhla, A., Ludwig, S. C., Kuhla, B., Münch, G., and Vollmar, B. (2015) Advanced glycation end products are mitogenic signals and trigger cell cycle reentry of neurons in Alzheimer's disease brain, *Neurobiol. Aging*, **36**, 753-761, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.09.025.
  20. Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., et al. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE, *Science*, **286**, 735-741, doi: 10.1126/science.286.5440.735.
  21. Wolfé, M. S., Xia, W., Moore, C. L., Leatherwood, D. D., Ostaszewski, B., et al. (1999) Peptidomimetic probes and molecular modeling suggest that Alzheimer's gamma-secretase is an intramembrane-cleaving aspartyl protease, *Biochemistry*, **38**, 4720-4727, doi: 10.1021/bi982562p.
  22. Belyaev, N. D., Kellett, K. A., Beckett, C., Makova, N. Z., Revett, T. J., et al. (2010) The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a  $\beta$ -secretase-dependent pathway, *J. Biol. Chem.*, **285**, 41443-41454, doi: 10.1074/jbc.M110.141390.
  23. Beckett, C., Nalivaeva, N. N., Belyaev, N. D., and Turner, A. J. (2012) Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: the AICD enigma, *Cell. Signal.*, **24**, 402-409, doi: 10.1016/j.cellsig.2011.10.007.
  24. Parvathy, S., Hussain, I., Karran, E. H., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (1999) Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by alpha-secretase occurs at the surface of neuronal cells, *Biochemistry*, **38**, 9728-9734, doi: 10.1021/bi9906827.
  25. Allinson, T. M., Parkin, E. T., Turner, A. J., and Hooper, N. M. (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases, *J. Neurosci. Res.*, **74**, 342-352, doi: 10.1002/jnr.10737.
  26. Asai, M., Hattori, C., Szabó, B., Sasagawa, N., Maruyama, K., Tanuma, S., and Ishiura, S. (2003) Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP alpha-secretase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**, 231-235, doi: 10.1016/s0006-291x(02)02999-6.
  27. Octave, J.-N., Pierrot, N., Santos, S. F., Nalivaeva, N. N., and Turner, A. J. (2013) From synaptic spines to nuclear signaling: nuclear and synaptic actions of the amyloid precursor protein, *J. Neurochem.*, **126**, 183-190, doi: 10.1111/jnc.12239.
  28. Chasseigneaux, S., and Allinquant, B. (2012) Functions of A $\beta$ , sAPP $\alpha$  and sAPP $\beta$ : similarities and differences, *J. Neurochem.*, **120 Suppl. 1**, 99-108, doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07584.x.
  29. Nalivaeva, N. N., and Turner, A. J. (2019) Targeting amyloid clearance in Alzheimer's disease as a therapeutic strategy, *Br. J. Pharmacol.*, **176**, 3447-3463, doi: 10.1111/bph.14593.
  30. Eckman, E. A., Adams, S. K., Troendle, F. J., Stodola, B. A., Kahn, M. A., et al. (2006) Regulation of steady-state beta-amyloid levels in the brain by neprilysin and endothelin-converting enzyme but not angiotensin-converting enzyme, *J. Biol. Chem.*, **281**, 30471-30478, doi: 10.1074/jbc.M605827200.
  31. Nalivaeva, N. N., Beckett, C., Belyaev, N. D., and Turner, A. J. (2012) Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in Alzheimer's disease? *J. Neurochem.*, **120**, Suppl. 1, 167-185, doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07510.x.
  32. Miners, J. S., Palmer, J. C., Tayler, H., Palmer, L. E., Ashby, E., et al. (2014) A $\beta$  degradation or cerebral perfusion? Divergent effects of multifunctional enzymes, *Front. Aging Neurosci.*, **6**, 238, doi: 10.3389/fnagi.2014.00238.
  33. Di Marco, L. Y., Farkas, E., Martin, C., Venneri, A., and Frangi, A. F. (2015) Is vasomotion in cerebral arteries impaired in Alzheimer's disease? *J. Alzheimer's Dis.*, **46**, 35-53, doi: 10.3233/JAD-142976.
  34. Nalivaeva, N. N., and Turner, A. J. (2017) Role of ageing and oxidative stress in regulation of amyloid-degrading enzymes and development of neurodegeneration, *Curr. Aging Sci.*, **10**, 32-40, doi: 10.2174/18746098096661611110111.
  35. Shi, X., Ohta, Y., Liu, X., Shang, J., Morihara, R., et al. (2019) Chronic cerebral hypoperfusion activates the coagulation and complement cascades in Alzheimer's disease mice, *Neuroscience*, **416**, 126-136, doi: 10.1016/j.neuroscience.2019.07.050.
  36. Morgese, M. G., Schiavone, S., and Trabace, L. (2017) Emerging role of amyloid beta in stress response: implication for depression and diabetes, *Eur. J. Pharmacol.*, **817**, 22-29, doi: 10.1016/j.ejphar.2017.08.031.
  37. Mouri, A., Zou, L. B., Iwata, N., Saido, T. C., Wang, D., et al. (2006) Inhibition of neprilysin by thiorphan (i.c.v.) causes an accumulation of amyloid beta and impairment of learning and memory, *Behav. Brain Res.*, **168**, 83-91, doi: 10.1016/j.bbr.2005.10.014.
  38. Devi, L., and Ohno, M. (2015) A combination Alzheimer's therapy targeting BACE1 and neprilysin in 5XFAD transgenic mice, *Mol. Brain*, **8**, 19, doi: 10.1186/s13041-015-0110-5.
  39. Poirier, R., Wolfer, D. P., Welzl, H., Tracy, J., Galsworthy, M. J., et al. (2006) Neuronal neprilysin overexpression is associated with attenuation of Abeta-related spatial memory deficit, *Neurobiol. Dis.*, **24**, 475-483, doi: 10.1016/j.nbd.2006.08.003.
  40. Bakthavachalam, P., and Shanmugam, P. S. T. (2017) Mitochondrial dysfunction – Silent killer in cerebral ischemia, *J. Neurol. Sci.*, **375**, 417-423, doi: 10.1016/j.jns.2017.02.043.
  41. Butterfield, D. A. (2002) Amyloid  $\beta$ -peptide (1-42)-induced oxidative stress and neurotoxicity: implications for neurodegeneration in Alzheimer's disease brain. A review, *Free Radic. Res.*, **36**, 1307-1313, doi: 10.1080/1071576021000049890.
  42. Angelova, P. R., and Abramov, A. Y. (2014) Interaction of neurons and astrocytes underlies the mechanism of Abeta-induced neurotoxicity, *Biochem. Soc. Trans.*, **42**, 1286-1290, doi: 10.1042/BST20140153.

43. Babusikova, E., Hatok, J., Dobrota, D., and Kaplan, P. (2007) Age-related oxidative modifications of proteins and lipids in rat brain, *Neurochem. Res.*, **32**, 1351-1356, doi: 10.1007/s11064-007-9314-0.
44. Umeno, A., Biju, V., and Yoshida, Y. (2017) *In vivo* ROS production and use of oxidative stress-derived biomarkers to detect the onset of diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and diabetes, *Free Radic Res.*, **51**, 413-427, doi: 10.1080/10715762.2017.1315114.
45. Butterfield, D. A., Reed, T., Newman, S. F., and Sultana, R. (2007) Roles of amyloid  $\beta$ -peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment, *Free Radic. Biol. Med.*, **43**, 658-677, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.05.037.
46. Nanetti, L., Raffaelli, F., Vignini, A., Perozzi, C., Silvestrini, M., et al. (2011) Oxidative stress in ischaemic stroke, *Eur. J. Clin. Invest.*, **41**, 1318-1322, doi: 10.1111/j.1365-2362.2011.02546.x.
47. Hawkins, C. L., and Davies, M. J. (2019) Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications, *J. Biol. Chem.*, **294**, 19683-19708, doi: 10.1074/jbc.REV119.006217.
48. Sies, H., and Jones, D. P. (2020) Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **21**, 363-383, doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
49. Nissanka, N., and Moraes, C. T. (2018) Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease, *FEBS Lett.*, **592**, 728-742, doi: 10.1002/1873-3468.12956.
50. Assi, M. (2017) The differential role of reactive oxygen species in early and late stages of cancer, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **313**, R646-R653, doi: 10.1152/ajpregu.00247.2017.
51. Petersen, D. R., and Doorn, J. A. (2004) Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets, *Free Radic. Biol. Med.*, **37**, 937-945, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2004.06.012.
52. Killkenny, C., Browne, W., Cuthill, I., Emerson, M., and Altman, D. (2010) Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research, *PLoS Biol.*, **8**, e1000412, doi: 10.1371/journal.pbio.1000412.
53. Pulsinelli, W. A., and Buchan, A. M. (1988) The four-vessel occlusion rat model: method for complete occlusion of vertebral arteries and control of collateral circulation, *Stroke*, **19**, 913-914, doi: 10.1161/01.str.19.7.913.
54. Babusiková, E., Kaplán, P., Lehotský, J., Jesenák, M., and Dobrota, D. (2004) Oxidative modification of rat cardiac mitochondrial membranes and myofibrils by hydroxyl radicals, *Gen. Physiol. Biophys.*, **23**, 327-335.
55. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Anal. Biochem.*, **150**, 76-85, doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
56. Pluta, R., Kida, E., Lossinsky, A. S., Golabek, A. A., Mossakowski, M. J., and Wisniewski, H. M. (1994) Complete cerebral ischemia with short-term survival in rats induced by cardiac arrest. I. Extracellular accumulation of Alzheimer's beta-amyloid protein precursor in the brain, *Brain Res.*, **649**, 323-328, doi: 10.1016/0006-8993(94)91081-2.
57. Hiltunen, M., Mäkinen, P., Peräniemi, S., Sivenius, J., van Groen, T., et al. (2009) Focal cerebral ischemia in rats alters APP processing and expression of Abeta peptide degrading enzymes in the thalamus, *Neurobiol. Dis.*, **35**, 103-113, doi: 10.1016/j.nbd.2009.04.009.
58. Koike, M. A., Garcia, F. G., Kitazawa, M., Green, K. N., and Laferla, F. M. (2011) Long term changes in phospho-APP and tau aggregation in the 3xTg-AD mice following cerebral ischemia, *Neurosci. Lett.*, **495**, 55-59, doi: 10.1016/j.neulet.2011.03.034.
59. Garcia-Alloza, M., Gregory, J., Kuchibhotla, K. V., Fine, S., Wei, Y., et al. (2011) Cerebrovascular lesions induce transient beta-amyloid deposition, *Brain*, **134**, 3697-3707, doi: 10.1093/brain/awr300.
60. Pimentel-Coelho, P. M., Michaud, J. P., and Rivest, S. (2013) Effects of mild chronic cerebral hypoperfusion and early amyloid pathology on spatial learning and the cellular innate immune response in mice, *Neurobiol. Aging*, **34**, 679-693, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2012.06.025.
61. Jendroska, K., Poewe, W., Daniel, S. E., Pluess, J., Iwarsen-Schmidt, H., Paulsen, J., et al. (1995) Ischemic stress induces deposition of amyloid beta immunoreactivity in human brain, *Acta Neuropathol.*, **90**, 461-466, doi: 10.1007/BF00294806.
62. Kövari, E., Herrmann, F. R., Hof, P. R., and Bouras, C. (2013) The relationship between cerebral amyloid angiopathy and cortical microinfarcts in brain ageing and Alzheimer's disease, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **39**, 498-509, doi: 10.1111/nan.12003.
63. Fraser, P. E., Nguyen, J. T., Inouye, H., Surewicz, W. K., Selkoe, D. J., et al. (1992) Fibril formation by primate, rodent, and Dutch-hemorrhagic analogues of Alzheimer amyloid  $\beta$ -protein, *Biochemistry*, **31**, 10716-10723, doi: 10.1021/bi00159a011.
64. Nalivaeva, N. N., Fisk, L., Kochkina, E. G., Plesneva, S. A., Zhuravin, I. A., et al. (2004) Effect of hypoxia/ischemia and hypoxic preconditioning/reperfusion on expression of some amyloid-degrading enzymes, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1035**, 21-33, doi: 10.1196/annals.1332.002.
65. Badan, I., Dinca, I., Buchhold, B., Suofu, Y., Walker, L., et al. (2004) Accelerated accumulation of N- and C-terminal  $\beta$ -APP fragments and delayed recovery of microtubule-associated protein 1B expression following stroke in aged rats, *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 2270-2280, doi: 10.1111/j.0953-816X.2004.03323.x.
66. Cai, Z., Liu, Z., Xiao, M., Wang, C., and Tian, F. (2017) Chronic cerebral Hypoperfusion promotes amyloid-beta pathogenesis via activating  $\beta/\gamma$ -secretases, *Neurochem. Res.*, **42**, 3446-3455, doi: 10.1007/s11064-017-2391-9.
67. Nalivaeva, N. N., Babusikova, E. B., Dobrota, D., and Turner, A. J. (2005) Effect of ischaemia and reperfusion on the content and degradation of amyloid precursor Protein in the hippocampus of rats, *Neirokhimia*, **22**, 207-212.
68. Pluta, R., Kocki, J., Ułamek-Kozioł, M., Petniak, A., Gil-Kulik, P., et al. (2016) Discrepancy in expression of beta-secretase and amyloid-beta protein precursor in Alzheimer-related genes in the rat medial temporal lobe cortex following transient global brain ischemia, *J. Alzheimer's Dis.*, **51**, 1023-1031, doi: 10.3233/JAD-151102.
69. Kocki, J., Ułamek-Kozioł, M., Bogucka-Kocka, A., Januszewski, S., Jabłoński, M., et al. (2015) Dysregulation of amyloid- $\beta$  protein precursor,  $\beta$ -Secretase, presenilin 1 and 2 genes in the rat selectively vulnerable CA1 subfield of hippocampus following transient global brain ischemia, *J. Alzheimer's Dis.*, **47**, 1047-1056, doi: 10.3233/JAD-150299.
70. Petcu, E. B., Sfredel, V., Platt, D., Herndon, J. G., Kessler, C., and Popa-Wagner, A. (2008) Cellular and molecular events underlying the dysregulated response of the aged brain to stroke: a mini-review, *Gerontology*, **54**, 6-17, doi: 10.1159/000112845.
71. Nalivaeva, N. N., Vasilev, D. S., Dubrovskaya, N. M., Turner, A. J., and Zhuravin, I. A. (2020) Role of neprilysin in synaptic plasticity and memory, *Russ. J. Physiol.*, **106**, 1191-1208, doi: 10.31857/S0869813920100076.
72. Bai, H. Y., Mogi, M., Nakaoka, H., Kan-No, H., Tsukuda, K., et al. (2015) Pre-treatment with LCZ696, an orally active angiotensin receptor neprilysin inhibitor, prevents ischemic brain damage, *Eur. J. Pharmacol.*, **762**, 293-298, doi: 10.1016/j.ejphar.2015.05.059.

73. Haynes, R., Zhu, D., Judge, P. K., Herrington, W. G., Kalra, P. A., and Baigent, C. (2020) Chronic kidney disease, heart failure and neprilysin inhibition, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **35**, 558-564, doi: 10.1093/ndt/gfz058.
74. Newell, A. J., Sue, L. I., Scott, S., Rauschkolb, P. K., Walker, D. G., et al. (2003) Thiorphan-induced neprilysin inhibition raises amyloid beta levels in rabbit cortex and cerebrospinal fluid, *Neurosci. Lett.*, **350**, 178-180, doi: 10.1016/s0304-3940(03)00902-9.
75. Li, W., Wu, Y., Min, F., Li, Z., Huang, J., and Huang, R. (2010) A nonhuman primate model of Alzheimer's disease generated by intracranial injection of amyloid-beta42 and thiorphan, *Metab. Brain Dis.*, **25**, 277-284, doi: 10.1007/s11011-010-9207-9.
76. Belyaev, N. D., Nalivaeva, N. N., Makova, N. Z., and Turner, A. J. (2009) Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer's disease, *EMBO Rep.*, **10**, 94-100, doi: 10.1038/embor.2008.222.
77. Venugopal, C., Pappolla, M. A., and Sambamurti, K. (2007) Insulysin cleaves the APP cytoplasmic fragment at multiple sites, *Neurochem. Res.*, **32**, 2225-2234, doi: 10.1007/s11064-007-9449-z.
78. García de la Cadena, S., and Massieu, L. (2016) Caspases and their role in inflammation and ischemic neuronal death. Focus on caspase-12, *Apoptosis*, **21**, 763-777, doi: 10.1007/s10495-016-1247-0.
79. Kozlova, D. I., Vasylev, D. S., Dubrovskaya, N. M., Nalivaeva, N. N., Tumanova, N. L., and Zhuravin, I. A. (2015) Role of caspase-3 in regulation of the amyloid-degrading neuropeptidase neprilysin level in the rat cortex after hypoxia, *J. Evol. Biochem. Physiol.*, **51**, 480-484, doi: 10.1134/S0022093015060046.
80. Chang, C. Z., Yen, C. P., Winadi, D., Wu, S. C., Howng, S. L., et al. (2004) Neuroprotective effect of CGS 26303, an endothelin-converting enzyme inhibitor, on transient middle cerebral artery occlusion in rats, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **44**, Suppl. 1, 487-489, doi: 10.1097/01.fjc.0000166307.86678.d1.
81. Li, R., Cui, M., Zhao, J., Yu, M., Ying, Z., Zhou, S., and Zhou, H. (2013) Association of endothelin-converting enzyme-1b C-338A polymorphism with increased risk of ischemic stroke in Chinese Han population, *J. Mol. Neurosci.*, **51**, 485-492, doi: 10.1007/s12031-013-0100-y.
82. Rodrigo, R., Fernández-Gajardo, R., Gutiérrez, R., Matamala, J. M., Carrasco, R., et al. (2013) Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities, *CNS Neurol. Disord. Drug Targets*, **12**, 698-714, doi: 10.2174/1871527311312050015.
83. Urikova, A., Babusikova, E., Dobrota, D., Drgova, A., Kaplan, P., et al. (2006) Impact of Ginkgo Biloba Extract EGb 761 on ischemia/reperfusion – induced oxidative stress products formation in rat forebrain, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **26**, 1343-1353, doi: 10.1007/s10571-006-9030-3.
84. Quan, H., Koltai, E., Suzuki, K., Aguiar, A. S. Jr., Pinho, R., et al. (2020) Exercise, redox system and neurodegenerative diseases, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1866**, 165778, doi: 10.1016/j.bbdis.2020.165778.
85. Zhuravin, I. A., Dubrovskaya, N. M., Vasilev, D. S., Kozlova, D. I., Kochkina, E. G., et al. (2019) Regulation of neprilysin activity and cognitive functions in rats after prenatal hypoxia, *Neurochem. Res.*, **44**, 1387-1398, doi: 10.1007/s11064-019-02796-3.

## EFFECT OF GLOBAL BRAIN ISCHEMIA ON AMYLOID PRECURSOR PROTEIN METABOLISM AND EXPRESSION OF AMYLOID-DEGRADING ENZYMES IN RAT CORTEX: ROLE IN PATHOGENESIS OF ALZHEIMER'S DISEASE

E. Babusikova<sup>1</sup>, D. Dobrota<sup>1</sup>, A. J. Turner<sup>2</sup>, and N. N. Nalivaeva<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Comenius University in Bratislava, Jessenius Faculty of Medicine in Martin, Department of Medical Biochemistry, 036 01 Martin, Slovakia

<sup>2</sup> School of Biomedical Sciences, Faculty of Biological Sciences, University of Leeds, Leeds, LS2 9JT United Kingdom

<sup>3</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 194223 St. Petersburg, Russia; E-mail: n.n.nalivaeva@leeds.ac.uk

The incidence of Alzheimer's disease (AD) increases significantly following chronic stress and brain ischemia which, over the years, cause accumulation of toxic amyloid species and brain damage. The effects of global 15-min ischemia and 120-min reperfusion on the levels of expression of the amyloid precursor protein (APP) and its processing were investigated in the brain cortex (Cx) of male Wistar rats. Additionally, the levels of expression of the amyloid-degrading enzymes neprilysin (NEP), endothelin-converting enzyme-1 (ECE-1), and insulin-degrading enzyme (IDE), as well as of some markers of oxidative damage were assessed. It was shown that the APP mRNA and protein levels in the rat Cx were significantly increased after the ischemic insult. Protein levels of the soluble APP fragments, especially of sAPP $\beta$  produced by  $\beta$ -secretase, (BACE-1) and the levels of BACE-1 mRNA and protein expression itself were also increased after ischemia. The protein levels of APP and BACE-1 in the Cx returned to the control values after 120-min reperfusion. The levels of NEP and ECE-1 mRNA also decreased after ischemia, which correlated with the decreased protein levels of these enzymes. However, we have not observed any changes in the protein levels of insulin-degrading enzyme. Contents of the markers of oxidative damage (di-tyrosine and lysine conjugates with lipid peroxidation products) were also increased after ischemia. The obtained data suggest that ischemia shifts APP processing towards the amyloidogenic  $\beta$ -secretase pathway and accumulation of the neurotoxic A $\beta$  peptide as well as triggers oxidative stress in the cells. These results are discussed in the context of the role of stress and ischemia in initiation and progression of AD.

**Keywords:** Alzheimer's disease, amyloid precursor protein,  $\beta$ -secretase, endothelin-converting enzyme-1, global brain ischemia, insulin-degrading enzyme, neprilysin, stress

УДК 577.25

## НЕОНАТАЛЬНЫЙ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С НЕЙРОВОСПАЛЕНИЕМ, В ГИППОКАМПЕ КРЫС

© 2021 А.А. Квичанский\*, Л.В. Третьякова, М.Н. Волобуева, А.О. Манолова, М.Ю. Степаничев, М.В. Онуфриев, Ю.В. Моисеева, Н.А. Лазарева, А.П. Большаков, Н.В. Гуляева

*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,  
117485 Москва, Россия; электронная почта: al.kvichans@gmail.com*

Поступила в редакцию 24.02.2021

После доработки 26.03.2021

Принята к публикации 27.03.2021

Исследовали дифференциальное влияние неонатального провоспалительного стресса (НПС) на развитие нейровоспаления в гиппокампе и депрессивно-подобного поведения у ювенильных и взрослых самцов и самок крыс. Индукция НПС при помощи введения бактериального липополисахарида в неонатальном периоде вызывает повышение экспрессии мРНК генов *Ib* и *Tnf* на фоне формирования депрессивно-подобного поведения у взрослых самцов крыс. У ювенильных самцов крыс НПС повышает экспрессию мРНК фракталкина и его рецептора в вентральном гиппокампе, однако этот эффект не сопровождается повышением экспрессии провоспалительных цитокинов и растворимой формы белка фракталкина. В дорсальном гиппокампе ювенильных самцов НПС снижает экспрессию мРНК фракталкина. У самок не было обнаружено достоверного влияния НПС на исследованные показатели. Таким образом, НПС индуцирует сложные долговременные изменения экспрессии генов, ассоциированных с нейровоспалением в разных областях гиппокампа, приводящие в конечном счёте к индукции нейровоспаления, которое, по-видимому, ассоциировано с развитием депрессивно-подобного поведения у самцов крыс.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** депрессия, нейровоспаление, цитокины, гиппокамп, межполовые различия.

DOI: 10.31857/S0320972521060075

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большое депрессивное расстройство является одним из наиболее распространённых в мире заболеваний [1]. Во многих экспериментальных исследованиях, посвящённых механизмам патогенеза депрессии, экспериментальных животных помещают в условия неизбежного стресса различной модальности, что приводит к индукции депрессивно-подобных состояний [2]. Модель неонатального провоспалительного стресса (НПС) является примером альтернативного подхода. В этой модели животных подвергают действию провоспалительных факторов в раннем постнатальном возрасте (на 3 и 5 постнатальные дни (ПНД)), что

программирует развитие тревожно-подобных и депрессивно-подобных нарушений поведения во взрослом возрасте [3, 4].

Механизмы программирования депрессивно-подобного состояния у взрослых животных при помощи НПС остаются не до конца понятными [5]. Известно, что бактериальный липополисахарид (ЛПС) активирует рецептор TLR-4, запуская неспецифический иммунный ответ. Этот же рецептор участвует в запуске нейровоспаления в мозге крыс, подвергшихся стрессу в модели выученной беспомощности [6]. НПС приводит к развитию периферического воспаления и нейровоспаления и вызывает ответ органов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси у новорождённых животных [7]. В настоящее время известно, что НПС может приводить к нарушению функционирования иммунной системы у подопытных животных [8, 9]. Можно предположить, что в условиях несформированного гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) воспаление, перенесённое в раннем постнатальном онтогенезе, индуцирует склонность к нейровоспалению у взрослеющих и взрослых особей.

Принятые сокращения: ВГ – вентральный гиппокамп; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ДГ – дорсальный гиппокамп; ЗФ – зубчатая фасция; ЛПС – бактериальный липополисахарид; НПС – неонатальный провоспалительный стресс; ПНД – постнатальные дни; ПС – поведенческий стресс; ТВП – тест вынужденного плавания; ТПС – тест предпочтения сахарозы; ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

\* Адресат для корреспонденции.

Нейровоспаление является специфической для нервной системы реакцией, сходной с классическим воспалением по набору участвующих молекулярно-клеточных механизмов. Данную реакцию характеризует повышение экспрессии провоспалительных медиаторов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО $\alpha$ ) в тканях ЦНС и функциональная активация клеток микроглии. Такая реакция впервые была описана как ответ на различные повреждения мозга, такие как травмы, токсические повреждения, гипоксия и инфекции, однако позже было показано, что нейровоспалительная реакция может запускаться и внутренними мозговыми стимулами [10]. В частности, нейровоспаление наблюдают как в моделях депрессии на животных [11], так и у пациентов, страдающих большим депрессивным расстройством [12]. Предполагается, что индукция нейровоспаления приводит к формированию депрессивно-подобного поведения у подопытных животных [13].

За последние 10 лет накоплено большое число данных о регуляции нейровоспаления. Установлена важность баланса концентрации в тканях мозга провоспалительных (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ФНО $\alpha$ ) и противовоспалительных (ИЛ-10 и другие) цитокинов, вырабатываемых клетками как иммунной, так и нервной систем [10]. ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  могут экспрессироваться большинством типов клеток, представленных в мозге, в зависимости от условий их функционального статуса и микроокружения. Ключевыми продуцентами ИЛ-6 в ЦНС интактных здоровых мышей являются активированные клетки микроглии в головном мозге и клетки эпендимы спинного мозга [14]. Наличие мРНК *Il10* в тканях ЦНС является предметом для дискуссии, но секретируемый белок представлен в мозге и является мощным противовоспалительным медиатором [15]. Особая роль принадлежит системе фракталкина (CX3CL1). Этот сигнальный белок синтезируется главным образом в нейронах, но показан его синтез и в других клетках ЦНС [14]. Рецептор фракталкина экспрессируется в мозге в основном клетками микроглии [14]. Фракталкин регулирует формирование зрелой микроглии в ходе формирования мозга (в т.ч. гиппокампа и соматосенсорной коры) в эмбриональном и раннем постнатальном периоде, а также миграцию макрофагов в ЦНС у взрослых животных [16–20]. Кроме того, в зрелом мозге фракталкин выполняет функции противовоспалительного медиатора, обеспечивающего отрицательную обратную связь от нейронов к микроглии [21].

Гиппокамп является одной из ключевых структур мозга, страдающих при депрессивных

состояниях [22, 23]. При этом гиппокамп и особенно зубчатая фасция (ЗФ), неоднородны вдоль продольной (септо-темпоральной – у людей и дорсо-вентральной – у мелких млекопитающих) оси. В результате воздействия кортикостероидов происходит изменение синаптической пластичности нейронов гиппокампа, при этом дорсальный гиппокамп (ДГ) и вентральный гиппокамп (ВГ) демонстрируют различную чувствительность к стрессу [24, 25]. При моделировании депрессии у животных, помимо нарушения синаптической пластичности нейронов, в ЗФ гиппокампа нарушается нейрогенез [22, 26, 27]. Так, в работе Zhang et al. [28] было показано, что в условиях обогащенной среды дорсальная и вентральная части гиппокампа реагируют неодинаково – в дорсальной части нейрогенез активнее и транскрипционный профиль также значительно отличается от вентральной. Транскриптомные и протеомные исследования показали, что реакция на стресс в дорсальной и вентральной частях гиппокампа различаются [29]. В предыдущих работах мы также показали, что НПС может вызывать изменения экспрессии генов, специфичные для ДГ и ВГ [30, 31].

Самцы и самки по-разному реагируют на стресс. В частности, Tenk et al. [32] показали, что самцы, подвергнутые НПС, сильнее теряют массу после повторной инъекции ЛПС во взрослом возрасте, чем самки после аналогичного воздействия. Между самцами и самками крыс в этой парадигме не было выявлено различия по концентрации медиаторов воспаления и глюкокортикостероидов (ГКС), но наблюдали зависимость от пола реакцию микроглии – снижение количества микроглиоцитов в гиппокампе самцов и повышение – в гиппокампе самок [7]. Можно предположить, что этот эффект лежит в основе дифференциальной предрасположенности самцов и самок к развитию депрессивно-подобных нарушений во взрослом возрасте [33].

Ранее мы показали, что введение ЛПС в раннем постнатальном периоде самцам крыс приводит к повышению тревожности у самцов ювенильных крыс (ПНД 30–36) в тестах открытого поля и приподнятого крестообразного лабиринта. У взрослых самцов крыс (ПНД 101–107), но не у ювенильных животных, наблюдали проявление депрессивно-подобного поведения [4]. Исходя из этих данных, мы посвятили работу изучению влияния НПС на экспрессию генов, ассоциированных с нейровоспалением (*Il1b*, *Il6*, *Tnf*, *Cx3cl1*, *Cx3cr1*), в гиппокампе взрослых животных обоего пола. Также мы изучили влияние НПС на морфологию микроглии в ДГ и ВГ ювенильных крыс обоего пола.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Животные.** В эксперименте использовали потомство крыс линии Wistar, полученных из питомника «Столбовая». Животных содержали в индивидуальных клетках со свободным доступом к пище и воде при 12-часовом световом цикле (свет 8:00–20:00). День родов считали постнатальным днём 0 (ПНД 0). После родов ограничивали численность выводка 9 особями. В возрасте ПНД 21 отсаживали родившую самку, выводок разделяли на самцов и самок и содержали по пометам. Для экспериментов брали как самцов, так и самок.

**Экспериментальные процедуры.** Выводки случайным образом делили на экспериментальные и контрольные. На ПНД 3 и ПНД 5 животных из экспериментальных выводков подвергали неонатальному провоспалительному стрессу путём введения подкожно стерильного раствора ЛПС в изотоническом растворе NaCl (10 мкл/г массы тела; 0,05 мг/кг ЛПС из *Escherichia coli*; серотип O26:B6, «Sigma-Aldrich», США). Крысам из пометов контрольной группы (Контроль) вводили соответствующий объём изотонического стерильного раствора NaCl. Выбранная доза ЛПС не вызывала гибели подопытных животных. Было проведено две серии экспериментов (рис. 1).

В первой серии экспериментов животных, достигших возраста 3 мес., подвергали хендлингу в течение 4-х дней, после чего делили на две подгруппы. С животными одной подгруппы проводили тесты предпочтения сахарозы (ТПС) и вынужденного плавания (ТВП). Другую подгруппу крыс оставляли в домашних клетках. Через 30 мин после завершения ТВП животных выводили из эксперимента путем декапитации под хлоралгидратным наркозом. Животных, не задействованных в поведенческих тестах, декапитировали в это же время. Образцы тканей из правого полушария использовали для изучения

экспрессии генов, из левого – для иммуноферментного анализа.

Крыс второй серии в возрасте 1 мес. выводили из эксперимента путём декапитации под хлоралгидратным наркозом. У части крыс брали мозг для исследования реакции микроглии в гиппокампе, а мозг остальных животных брали для изучения экспрессии генов (правое полушарие) и проведения иммуноферментного анализа (левое полушарие).

**Исследование поведения. Тест предпочтения сахарозы (ТПС).** Процедура состояла из двух сеансов. В ходе первого сеанса крыс приучали к потреблению раствора сахарозы в условиях, сходных с условиями теста. Для этого животных помещали в индивидуальные клетки, где после 2 мин привыкания им предъявляли две поилки. В одной из поилок была вода, в другой – 20%-ный раствор сахарозы [34]. Приучение длилось 15 мин. На следующий день животных помещали в те же клетки, где после 2 мин привыкания им предъявляли предварительно взвешенные поилки, а через 1 ч фиксировали изменение массы поилок. Предпочтение сахарозы оценивали, исходя из индекса, рассчитываемого по формуле: индекс = (масса выпитого раствора сахарозы/масса выпитого раствора сахарозы + масса выпитого раствора воды) × 100%. Оба сеанса проводили в вечернее время (17:00–20:00).

**Тест вынужденного плавания (ТВП).** Тестирование поведения проводили в прозрачных цилиндрах высотой 40 см и диаметром 20 см («Открытая наука», Россия), наполненных водой (23 ± 1 °С) через 2 дня после ТПС. В первый день ТВП крыс запускали в цилиндры на 15 мин, после чего вынимали, вытирали полотенцем, высушивали под струёй тёплого воздуха и после этого возвращали в домашние клетки. На следующий день крыс помещали в цилиндры на 5 мин. Поведение крыс записывали с помощью видеокамеры. Анализ поведения прово-

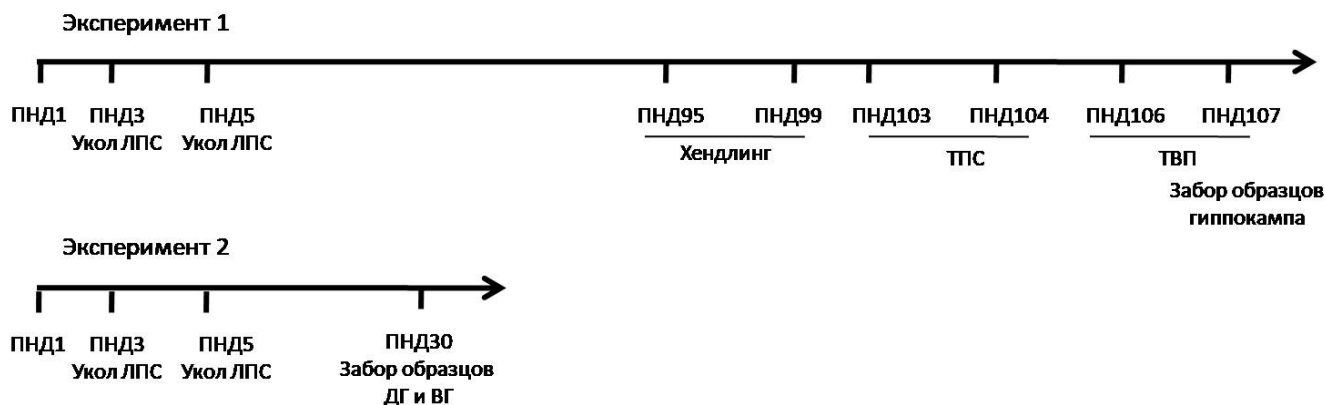


Рис. 1. Схема экспериментов

дили по видеозаписям, оценивая время пассивного плавания (иммобильности). Под иммобильностью понимали такое положение животных, при котором они не совершали плавательных движений, за исключением тех, что были необходимы для поддержания головы над поверхностью воды. Стоит отметить, что ТВП, сам по себе, является стрессующей парадигмой для подопытных животных. Перенесённый поведенческий стресс (ПС) может вызывать изменения экспрессии генов и морфологии микроглии [35].

**Биохимический и молекулярно-биологический анализ. Подготовка ткани мозга для изучения экспрессии генов.** Через 30 мин после последнего поведенческого теста крыс декапитировали под хлоралгидратным наркозом, мозг вынимали, промывали в ледяном изотоническом растворе NaCl, выделяли гиппокампы (цельные, или ДГ и ВГ по отдельности) из правого полушария и замораживали их в жидком азоте. ДГ считали дорсальную половину гиппокампа вдоль дорсально-вентральной оси, ВГ – вентральную четверть. В случае выделения ДГ и ВГ остатки ткани гиппокампа не анализировали. Образцы гомогенизировали в реактиве для выделения РНК (ExtractRNA, «Евроген», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя, и выделяли фракцию тотальной РНК. РНК в ходе работы хранили в виде раствора в деионизованной воде и долговременно – в виде осадка в 80% этаноле.

**Количественная ПЦР «в реальном времени».**

1 мкг РНК подвергали обработке ДНКазой при помощи набора DNAaseI («Thermo Fisher Scientific», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Половину обработанной РНК использовали для проведения реакции обратной транскрипции при помощи набора реактивов MMLV RT kit («Евроген»), используя ингибитор РНКаз RNase Inhibitor («New England Biolabs», США) в соответствии с рекомендациями производителей. Использовали эквимольную смесь случайного декапраймера («Евроген», SB002) и олиго(dT)<sub>15</sub>-праймера («Евроген», SB001), концентрация каждого праймера в реакционной системе составляла 1 мкМ. После обратной транскрипции полученный продукт разводили в 8 раз деионизованной водой. Вторую половину РНК, обработанной ДНКазой, использовали в качестве отрицательного контроля «без обратной транскрипции». Экспрессию целевых генов анализировали при помощи набора «Готовая смесь для ПЦР qPCRmix-HS SYBR+LowROX» («Евроген», PK156L) при помощи станции для количественной ПЦР CFX384 Touch («Bio-Rad», США). Праймеры подбирали на основе последовательностей из базы данных NCBI в программном пакете Lasergene PrimerSelect. Последовательности праймеров, использованных в работе, приведены в таблице.

В качестве нормировочного гена использовали праймеры к кДНК гена *Hprt*, выбранного

Последовательности праймеров, использованных в работе

Ген	Последовательности праймеров (5'–3')	
	Прямой	Обратный
<i>Il1b</i> NM_031512.2	TCTGTGACTCGTGGGATGAT	CACTTGTGGCTTATGTTCTGTC
<i>Il6</i> NM_012589.2	GCCACTGCCTTCCCTACTTCAC	GACAGTGCATCATCGCTGTTTCATAC
<i>Tnf</i> NM_012675.3	GTCCAACTCCGGGCTCAGAAT	ACTCCCCGATCCACTCAG
<i>Il10</i> NM_012854.2	GACAATAACTGCACCCACTTCC	GCATCACTTCTACCAGGTA AAACTTG
<i>Cx3cl1</i> NM_134455.2	ATCACCACCATCACCACCAAC	GAGGAACACTTTAAACCCCTCACAGA
<i>Cx3cr1</i> NM_133534.2	GGACCTCACCATGCCTACCT	CACCAACAGATCCCCACCAG
<i>Hprt</i> NM_012583.2	CGTCGTGATTAGTGATGATGAAC	CAAGTCTTTCAGTCTGTCCATA



по результатам анализа транскриптома гиппокампа крысы [36]. Относительную представленность транскриптов оценивали по методу  $E^{\Delta\Delta Ct}$ . Эффективность реакции измеряли для каждого рабочего разведения праймеров методом серийных разведений. Во всех экспериментах эффективность реакции находилась в диапазоне 1,8–2,0. Каждую пробу дублировали, кроме того, для каждой пробы и каждого гена ставили контроль «без обратной транскрипции». Для каждой лунки контролировали температуру плавления продукта ПЦР. Данные на графиках представлены в виде относительного количества:

$$\text{Относительное количество} = \frac{E_i^{\Delta Ct_i}}{E_{Hprt}^{\Delta Ct_{Hprt}}}$$

**Иммуноферментный анализ.** Отделы мозга гомогенизировали на льду в буфере для экстракции растворимых белков (1%-ный NP-40 («Sigma-Aldrich», США) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ, «ПанЭко», Россия), pH 7,5) при помощи гомогенизатора Поттера 10 ударами пестика при 1000 об./мин. Гомогенат центрифугировали 20 мин при 4 °C и 13 200 g. Супернатант отбирали и хранили при –20 °C. Концентрацию белка в пробах измеряли при помощи набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit («Thermo Fisher Scientific»). Концентрацию растворимой фракции фракталкина, ИЛ-6 и ИЛ-1β в пробах определяли при помощи наборов Rat CX3CL1/Fractalkine DuoSet ELISA, Rat IL-6 Quantikine ELISA Kit и Rat IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA («R&D Systems», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Каждую пробу дублировали, сигнал детектировали при помощи планшетного ридера Hidex Sense («Hidex», Финляндия).

**Изучение реакции микроглии в гиппокампе.** Мозг крысы фиксировали погружением в 50 мл 4%-ного раствора параформальдегида в ФСБ, pH 7,5 на 1 ч. Затем заменяли фиксатор на свежий и инкубировали в нем следующие 24 ч.

Для иммуногистохимического окрашивания готовили фронтальные срезы толщиной 50 мкм на вибрационном микротоме Leica VT1200 S («Leica Biosystems», Германия). Срезы помещали в криопротекторную среду (ФСБ/глицерин/этиленгликоль = 1/0,75/0,75 (v/v)) и хранили при –20 °C до обработки. Перед окрашиванием срезы трижды промывали в 0,3%-ном (w/v) Triton X-100 («Serva», Германия) в ФСБ (ФСБТ), и блокировали неспецифичное связывание антител, для чего инкубировали в 5%-ной нормальной козьей сыворотке («Sigma-Aldrich», США) в ФСБТ. Затем срезы в течение ночи ин-

кубировали с первичными поликлональными антителами Rabbit anti-Iba1 IgG («Wako», Япония) в разведении 1/1000 при температуре 4 °C. На следующий день после трех отмывок в ФСБТ срезы инкубировали (2 ч при комнатной температуре) со вторичными антителами Goat anti-Rabbit IgG (H+L), конъюгированными с Alexa488 («Thermo Fisher Scientific»). После трех отмывок в ФСБ срезы заключали под покровные стекла в среду для заливки препаратов ProLong Gold («Thermo Fisher Scientific»), препятствующую выгоранию, с подкрашиванием клеточных ядер DAPI («Invitrogen», США) и хранили при –20 °C до использования.

Для проведения морфологического анализа микроглиальных клеток получали z-стеки с помощью микроскопа Zeiss Axio Imager Z2, оснащённого объективом EC Plan-NEOFLUAR 40× (NA = 0,75) и цифровой камерой MRm («Carl Zeiss», Германия). Количество изображений в z-стеке было фиксированным (17), расстояние между ними было установлено оптимальным (0,61 мкм). Фотографировали поля CA1 и CA3 гиппокампа и хилус зубчатой фасции, используя следующие координаты: для дорсального гиппокампа AP 2,80–3,80 мм и для вентрального – AP 4,80–5,30 мм, согласно атласу мозга [37]. Для каждого животного было получено по два изображения из каждой области.

Для последующей обработки изображений, подсчёта числа клеток и оценки степени активации микроглии использовали программное обеспечение Fiji (NIH, США). Для подсчёта клеток микроглии из z-стека получали проекцию максимальной интенсивности. Подсчитывали количество Iba1-позитивных клеток, содержащих чётко очерченную сому клетки и не менее двух отростков. Клетки, сома которых пересекала левую или нижнюю границы изображения, не учитывали. Для оценки активации микроглии рассчитывали фрактальную размерность контура отдельных клеток с использованием плагина FracLac для Fiji [33]. Чтобы получить контур микроглиальной клетки использовали последовательность преобразования изображений, предложенную Young и Morrison [38], с некоторыми модификациями [39]. Вкратце, эта последовательность включала в себя следующие шаги: 1 – получение проекции максимальной интенсивности; 2 – преобразования, усиливающие контрастность изображения и оптимизирующие соотношение сигнал/шум; 3 – вырезание из изображения отдельных клеток микроглии (с каждого изображения брали по три клетки с чётко видимой сомой и отростками); 4 – бинаризация изображений отдельных клеток; 5 – получение контура отдельных клеток из

бинаризованного изображения. Всего было проанализировано по шесть клеток у каждого животного в каждом из исследованных отделов гиппокампа. Фрактальная размерность контура объекта тем выше, чем сильнее его извилистость. Так, например, для такого простого объекта, как окружность, фрактальная размерность равна 1. Для амебоидной микроглии фрактальная размерность, как правило, составляет  $\sim 1,2$ , а для разветвлённой рамифицированной микроглии –  $1,5$ . Таким образом, оценку фрактальной размерности можно использовать для оценки степени активированности микроглии.

**Статистическая обработка данных.** Данные о поведении крыс и о морфологии клеток гиппокампа на графиках представлены в виде наложения столбчатых диаграмм (среднее  $\pm$  SE) и точечных диаграмм, во всех группах  $n \geq 5$ . Данные об экспрессии генов и концентрации их белковых продуктов на графиках представлены в виде наложения диаграмм размаха и точечных диаграмм, во всех группах  $n \geq 5$ . Распределение переменных в выборке оценивали на соответствие нормальному с помощью критерия Шапиро–Уилка. Достоверность различий в исследовании поведения и морфологии клеток гиппокампа определяли двухфакторным дисперсионным анализом с последующим апостериорным анализом по методу Фишера или Тьюки в зависимости от применимости методов в программном пакете Statistica 12. В качестве факторов для независимых переменных использовали «пол» и «НПС». В исследованиях экспрессии мРНК и концентрации белков распределение переменных не соответствовало нормальному по критерию Шапиро–Уилка, поэтому достоверность различий между ДГ и ВГ определяли по методу Уилкоксона, достоверность различий между экспериментальными группами выявляли по методу Манна–Уитни с поправкой Бонферрони (3 гипотезы,  $\alpha = 0,017$ ) в программном пакете Statistica 12.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Исследование поведения взрослых крыс.** Перенесённый НПС приводил к появлению признаков депрессивно-подобного поведения у взрослых крыс в тесте вынужденного плавания. Было выявлено взаимодействие факторов «пол» и «НПС»  $F(1, 35) = 4,81, p = 0,034$ . Апостериорное сравнение средних выявило повышение времени пассивного плавания у самцов, подвергнутых НПС (тест Тьюки,  $p = 0,036$ ), но не выявил значимых изменений поведения у самок (рис. 2). Таким образом, самцы демонстри-

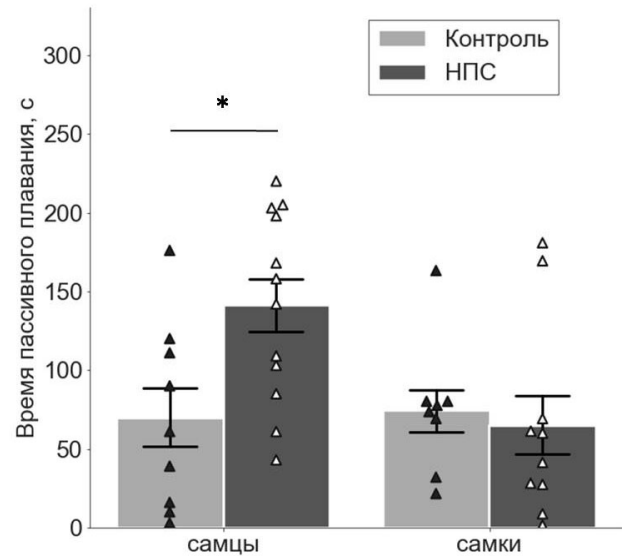
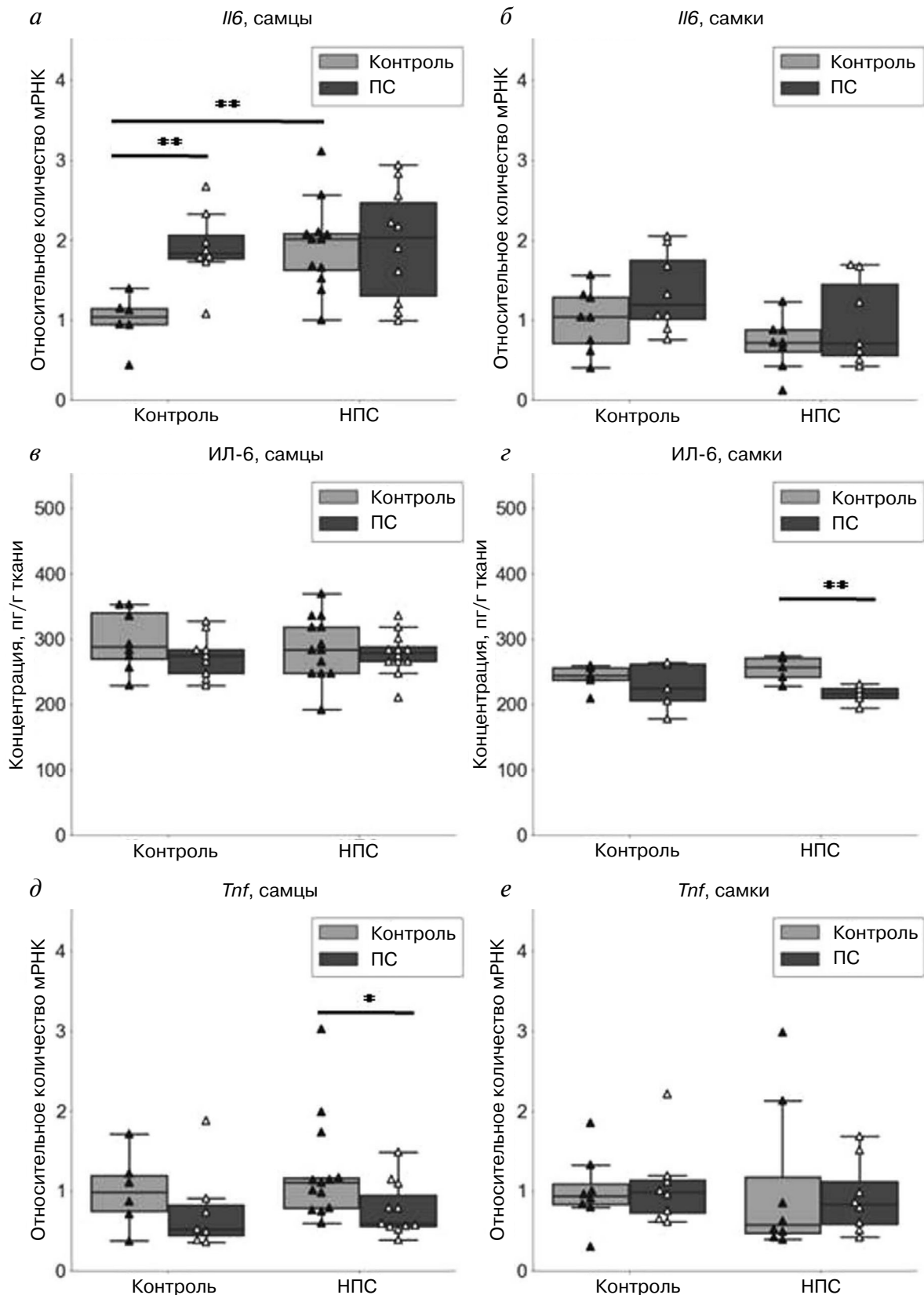


Рис. 2. Индукция депрессивно-подобного поведения НПС у взрослых самцов и самок крыс. \*  $p < 0,05$ , тест Тьюки

ровали развитие так называемого «поведения отчаяния», которое зачастую интерпретируют как депрессивно-подобное, тогда как самки демонстрировали относительную устойчивость к развитию депрессивно-подобного поведения.

Не было выявлено достоверного влияния пола, НПС и взаимодействия факторов на потребление сахарозы взрослыми крысами (данные не представлены).

**Экспрессия генов, ассоциированных с нейровоспалением, в гиппокампе взрослых крыс.** Влияние перенесённого НПС на экспрессию мРНК *Il1b*, *Il6*, *Tnf*, *Cx3cl1* и *Cx3cr1*, а также на концентрацию белка ИЛ-6 было исследовано в гиппокампе взрослых самцов и самок крыс, которые либо оставались в домашних клетках, либо принимали участие в ТВП. Мы обнаружили, что в гиппокампе взрослых самцов крыс, перенёвших НПС, экспрессия мРНК *Il6* была выше, чем у контрольных животных независимо от того, были они подвергнуты испытанию в ТВП или нет ( $p = 0,008$  и  $p = 0,003$  соответственно; тест Манна–Уитни, рис. 3, а). Однако этот эффект не сопровождался изменением концентрации белка ИЛ-6 в гиппокампе взрослых самцов (рис. 3, в). Не было выявлено влияния НПС, ПС и их сочетания на экспрессию мРНК этого цитокина у самок (рис. 3, б), однако, парадоксально, ПС приводил к снижению концентрации ИЛ-6 у самок, подвергнутых НПС ( $p = 0,014$ , рис. 3, з). Кроме того, НПС не приводил к достоверному повышению экспрессии мРНК *Tnf*, хотя была выявлена тенденция к снижению этого параметра под действием ПС у самцов, подвергнутых НПС ( $p = 0,027$ , тест



**Рис. 3.** Экспрессия генов, ассоциированных с нейровоспалением в гиппокампе взрослых крыс. *а* – Экспрессия мРНК *Il6* в гиппокампе самцов, *б* – экспрессия мРНК *Il6* в гиппокампе самок, *в* – концентрация ИЛ-6 в гиппокампе самцов, *г* – концентрация ИЛ-6 в гиппокампе самок, *д* – экспрессия мРНК *Tnf* в гиппокампе самцов, *е* – экспрессия мРНК *Tnf* в гиппокампе самок. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,017$ , тест Манна–Уитни

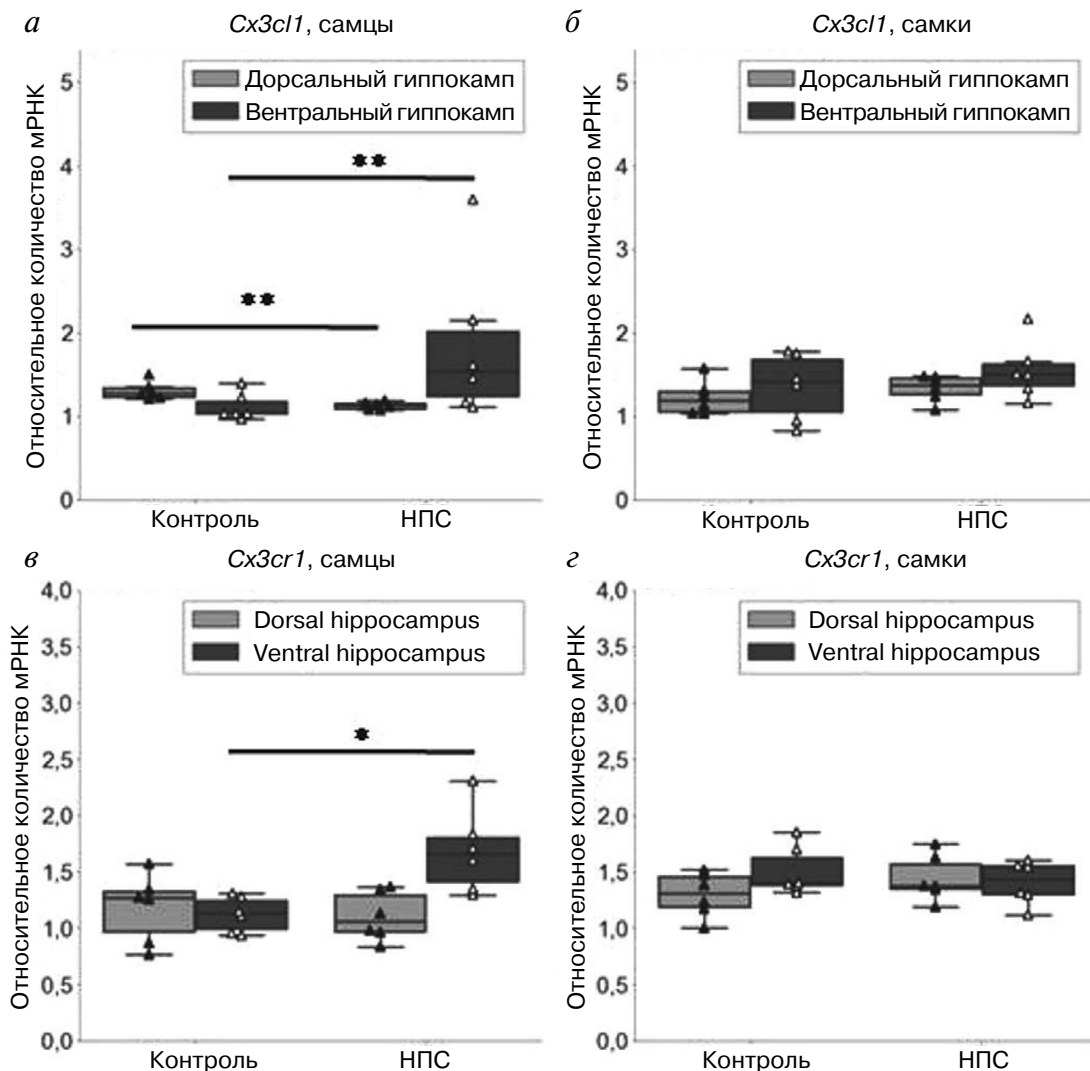
Манна–Уитни, рис. 3, *д*). Не было выявлено влияния НПС и ПС на экспрессию мРНК *Tnf* в гиппокампе самок (рис. 3, *е*). Таким образом, мы обнаружили, что НПС и ПС индуцируют экспрессию мРНК *Ilf* в гиппокампе самцов крыс на фоне развития депрессивно-подобного поведения.

Не было выявлено влияния НПС и ПС на экспрессию мРНК *Ilfb*, *Cx3cl1* и его рецептора *Cx3cr1* в гиппокампе взрослых крыс (данные не представлены).

**Экспрессия генов, ассоциированных с нейровоспалением, в ДГ и ВГ ювенильных крыс.** Для изучения возможных механизмов, участвующих в формировании предрасположенности к депрессивно-подобному поведению, мы изучили влияние НПС на экспрессию генов, ассоцииро-

ванных с нейровоспалением в ДГ и ВГ самцов и самок ювенильных крыс.

Мы обнаружили, что во всех экспериментальных группах наблюдается больший уровень экспрессии мРНК *Ilfb* в ВГ по сравнению с ДГ (в 4,7 раза у самцов и в 3,4 раза у самок) и меньший уровень экспрессии мРНК *Tnf* (в 1,9 раза у крыс обоего пола) в этих же структурах (тест Вилкоксона,  $p < 0,05$ ). Было выявлено снижение экспрессии мРНК *Cx3cl1* в ДГ ювенильных самцов под действием НПС ( $p = 0,005$ , тест Манна–Уитни). Кроме того, было выявлено повышение экспрессии мРНК этого хемокина ( $p = 0,005$ , тест Манна–Уитни) и тенденция к повышению экспрессии мРНК его рецептора *Cx3cr1* ( $p = 0,03$ , тест Манна–Уитни) в ВГ ювенильных самцов под действием НПС. Однако



**Рис. 4.** Влияние НПС на экспрессию генов, ассоциированных с нейровоспалением в ДГ и ВГ ювенильных крыс. *а* – Экспрессия мРНК *Cx3cl1* в ДГ и ВГ самцов, *б* – экспрессия мРНК *Cx3cl1* в ДГ и ВГ самок, *в* – экспрессия мРНК *Cx3cr1* в ДГ и ВГ самцов, *г* – экспрессия мРНК *Cx3cr1* в ДГ и ВГ самок. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,017$ , тест Манна–Уитни

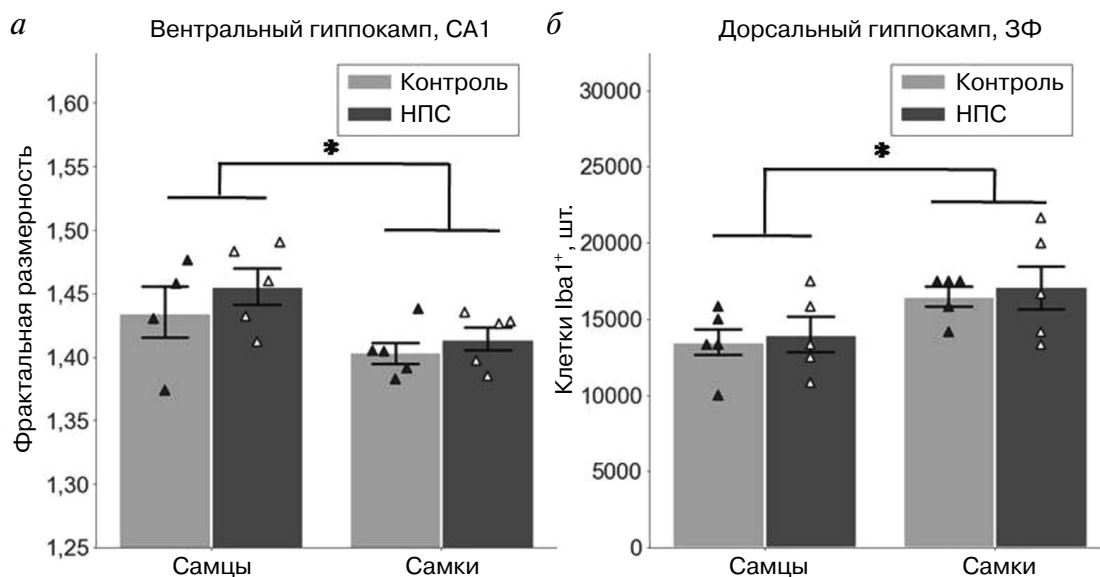


Рис. 5. Влияние НПС на морфологию клеток микроглии в ДГ и ВГ ювенильных крыс. *а* – Фрактальная размерность Iba1-позитивных клеток в области СА1 ВГ, *б* – количество клеток Iba1+ в ЗФ ДГ. \*  $p < 0,05$ , тест Фишера

эти эффекты не сопровождалось изменениями экспрессии провоспалительных цитокинов и растворимой формы белка фракталкина. У самок не было обнаружено достоверных изменений, вызванных НПС (рис. 4). Уровень экспрессии мРНК *Il10* был ниже порога детекции (данные не представлены). Таким образом, не было обнаружено признаков нейровоспалительной реакции в ДГ и ВГ ювенильных крыс, подвергнутых НПС. Однако были выявлены специфические для отделов гиппокампа изменения экспрессии мРНК фракталкина и его рецептора.

**Исследование морфологии микроглии в ДГ и ВГ ювенильных крыс.** Выявлена достоверно большая фрактальная размерность клеток микроглии в СА1 ВГ самцов по сравнению с самками ( $F(1, 15) = 6,36$ ,  $p = 0,016$ , критерий Фишера, рис. 5, *а*). Кроме того, в ЗФ ДГ самцов наблюдали большее число Iba1-позитивных клеток ( $F(1, 16) = 6,95$ ,  $p = 0,015$ , критерий Фишера, рис. 5, *б*). Влияния НПС, взаимодействия пола и НПС и достоверных различий в СА3 не выявлено (данные не представлены). Таким образом, нельзя заключить, что НПС влияет на морфологию клеток микроглии в гиппокампе ювенильных крыс.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы продемонстрировали формирование депрессивно-подобного поведения в ТВП у взрослых самцов, но не у самок крыс, подвергнутых НПС. Вместе с тем не было выявлено

влияния НПС на потребление сахарозы экспериментальными животными. Можно предположить, что нарушения, развившиеся у подопытных животных, затрагивают системы мозга, ответственные за реакцию на стресс, но не ответственные за гедонистическое поведение.

Экспрессия мРНК *Il6* была повышена в гиппокампе взрослых самцов, подвергнутых НПС, у самок аналогичного эффекта выявлено не было. Это может указывать на развитие хронического нейровоспаления у самцов, приводящего к депрессивно-подобному состоянию. ПС вызывал повышение экспрессии мРНК *Il6* в гиппокампе самцов, не подвергнутых НПС, до уровня, наблюдаемого у животных, подвергнутых НПС, но не подвергнутых ПС. Эти данные хорошо согласуются с данными о повышении экспрессии мРНК данного цитокина в микроглии под действием хронического стресса [40]. В то же время не было выявлено влияния НПС и ПС на концентрацию белка ИЛ-6 в гиппокампе взрослых крыс. Можно предположить, что синтез этого цитокина происходит локально с быстрой секрецией и утилизацией комплекса ИЛ-6 и его рецепторов клетками-мишенями. Кроме того, для данного цитокина известно активное вторичное использование клетками иммунной системы, что не требует повышения средней концентрации ИЛ-6 в ткани [41]. Важным свойством ИЛ-6 может оказаться его способность сдвигать соотношение субпопуляций Treg/Th17-лимфоцитов в сторону Th17, которые осуществляют провоспалительную функцию [42]. Показана связь накопления в мозге

Th17-лимфоцитов с развитием депрессии, вызванной хроническим стрессом [43].

Не было выявлено влияния собственно НПС на экспрессию мРНК *Tnf* у взрослых животных обоего пола, а дополнительный стресс, связанный с ТВП, парадоксально приводил к снижению экспрессии мРНК *Tnf* в гиппокампе взрослых самцов, подвергнутых НПС. Можно предположить, что острый стресс, ассоциированный с вынужденным плаванием, вызывал активацию неизвестных противовоспалительных механизмов, подавлявших экспрессию мРНК *Tnf* у этих животных.

Мы обнаружили повышение экспрессии мРНК фракталкина и его рецептора у ювенильных самцов в ВГ через месяц после НПС, однако фрактальная размерность и количество клеток микроглии у этих животных не отличались от контрольных. Можно предположить, что у этих животных усиленно работает отрицательная обратная связь от нейронов к микроглии, направленная на подавление провоспалительной активности [21]. Отсутствие изменения концентрации растворимого фракталкина не является строгим доказательством отсутствия повышения синтеза белкового продукта гена *Cx3cl1*. Этот белок экспонируется на поверхности клеток в виде функционально активного трансмембранного белка, который может подвергаться протеолитическому расщеплению с образованием растворимой формы, вероятно, без изменения способности активировать его рецептор [44]. Трансмембранная форма фракталкина недоступна для иммуноферментного анализа и не была исследована в нашей работе. Предполагают, что в зрелом мозге фракталкин является противовоспалительным медиатором, обеспечивающим отрицательную обратную связь от нейронов к микроглии. В то же время известно, что рецептор фракталкина регулирует миграцию моноцитов через ГЭБ и их активацию в ходе развития нейровоспалительной реакции в некоторых моделях патологий, и подавление этого про-

цесса снижает интенсивность нейровоспаления [16–20]. В прямом эксперименте введение в гиппокамп растворимого фракталкина вызывает активацию микроглии [45]. Таким образом, наблюдается двойственный характер регуляции нейровоспалительной реакции фракталкином. Можно предположить, что растворимая форма фракталкина может выступать в качестве локального провоспалительного агента, привлекающего клетки иммунной системы в очаг воспаления через ГЭБ, в то время как трансмембранная форма может выступать в качестве негативного иммунного регулятора. Можно предположить, что повышение экспрессии мРНК *Cx3cr1* является признаком изменения свойств микроглии, а повышение экспрессии *Cx3cl1* – попыткой ткани мозга скомпенсировать нарастающие нарушения. Сходные эффекты детектируют в ДГ крыс, подвергнутых стрессу иммобилизации, также индуцирующему депрессивно-подобное поведение [46]. Небольшое по амплитуде, но достоверное снижение экспрессии мРНК фракталкина в ДГ может указывать на неизвестные механизмы регуляции нейровоспаления, отличающиеся в ДГ и ВГ. Можно предположить, что в дальнейшем изменения свойств микроглии приводят к программированию склонности к развитию нейровоспаления у взрослых крыс.

**Финансирование.** Исследование поведения животных поддержано средствами государственного бюджета в соответствии с государственным заданием Министерства образования и науки Российской Федерации. Исследование морфологии микроглии поддержано Российским научным фондом (грант № 19-75-00063).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Все принятые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kupfer, D. J., Frank, E., and Phillips, M. L. (2012) Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives, *Lancet*, **379**, 1045-1055, doi: 10.1016/S0140-6736(11)60602-8.
2. Stepanichev, M., Dygalo, N. N., Grigoryan, G., Shishkina, G. T., and Gulyaeva, N. (2014) Rodent models of depression: Neurotrophic and neuroinflammatory biomarkers, *Biomed Res. Int.*, **2014**, 932757, doi: 10.1155/2014/932757.
3. Bilbo, S., and Schwarz, J. (2009) Early-life programming of later-life brain and behavior: a critical role for the immune system, *Front. Behav. Neurosci.*, **3**, 14, doi: 10.3389/neuro.08.014.2009.
4. Tishkina, A., Stepanichev, M., Kudryashova, I., Freiman, S., Onufriev, M., et al. (2016) Neonatal proinflammatory challenge in male Wistar rats: effects on behavior, synaptic plasticity, and adrenocortical stress response, *Behav. Brain Res.*, **304**, 1-10, doi: 10.1016/j.bbr.2016.02.001.
5. Spencer, S. J., and Meyer, U. (2017) Perinatal programming by inflammation, *Brain Behav. Immun.*, **63**, 1-7, doi: 10.1016/j.bbi.2017.02.007.
6. Cheng, Y., Pardo, M., Armini, R., Martinez, A., Mouhsine, H., et al. (2016) Stress-induced neuroinflammation is mediated by GSK3-dependent TLR4 signaling that promotes susceptibility to depression-like behavior,

- Brain. Behav. Immun.*, **53**, 207-222, doi: 10.1016/j.bbi.2015.12.012.
7. Claypoole, L. D., Zimmerberg, B., and Williamson, L. L. (2017) Neonatal lipopolysaccharide treatment alters hippocampal neuroinflammation, microglia morphology and anxiety-like behavior in rats selectively bred for an infantile trait, *Brain Behav. Immun.*, **59**, 135-146, doi: 10.1016/j.bbi.2016.08.017.
  8. Barth, C. R., Luft, C., Funchal, G. A., Oliveira, J. R., de Porto, B. N., and Donadio, M. V. F. (2016) LPS-induced neonatal stress in mice affects the response profile to an inflammatory stimulus in an age and sex-dependent manner, *Dev. Psychobiol.*, **58**, 600-613, doi: 10.1002/dev.21404.
  9. Walker, F. R., Hodyl, N. A., and Hodgson, D. M. (2009) Neonatal bacterial endotoxin challenge interacts with stress in the adult male rat to modify KLH specific antibody production but not KLH stimulated ex vivo cytokine release, *J. Neuroimmunol.*, **207**, 57-65, doi: 10.1016/j.jneuroim.2008.11.012.
  10. Estes, M. L., and McAllister, A. K. (2014) Alterations in immune cells and mediators in the brain: it's not always neuroinflammation! *Brain Pathol.*, **24**, 623-630, doi: 10.1111/bpa.12198.
  11. Kubera, M., Obuchowicz, E., Goehler, L., Brzeszcz, J., and Maes, M. (2011) In animal models, psychosocial stress-induced (neuro)inflammation, apoptosis and reduced neurogenesis are associated to the onset of depression, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **35**, 744-759, doi: 10.1016/j.pnpbp.2010.08.026.
  12. Setiawan, E., Wilson, A. A., Mizrahi, R., Rusjan, P. M., Miler, L., et al. (2015) Role of translocator protein density, a marker of neuroinflammation, in the brain during major depressive episodes, *JAMA Psychiatry*, **72**, 268, doi: 10.1001/jamapsychiatry.2014.2427.
  13. Wang, Y., Cui, X. L., Liu, Y. F., Gao, F., Wei, D., et al. (2011) LPS inhibits the effects of fluoxetine on depression-like behavior and hippocampal neurogenesis in rats, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **35**, 1831-1835, doi: 10.1016/j.pnpbp.2011.07.004.
  14. Zeisel, A., Hochgerner, H., Lönnerberg, P., Johnsson, A., Memic, F., et al. (2018) Molecular architecture of the mouse nervous system, *Cell*, **174**, 999-1014.e22, doi: 10.1016/j.cell.2018.06.021.
  15. Pisanu, A., Lecca, D., Mulas, G., Wãrdas, J., Simbula, G., et al. (2014) Dynamic changes in pro- and anti-inflammatory cytokines in microglia after PPAR- $\gamma$  agonist neuroprotective treatment in the MPTP mouse model of progressive Parkinson's disease, *Neurobiol. Dis.*, **71**, 280-291, doi: 10.1016/j.nbd.2014.08.011.
  16. Tremblay, M. È., and Sierra, A. (2014) *Microglia in Health and Disease. Chapter 1. Introduction*, doi: 10.1007/978-1-4939-1429-6.
  17. Tang, Z., Gan, Y., Liu, Q., Yin, J. X., Liu, Q., Shi, J., and Shi, F. D. (2014) CX3CR1 deficiency suppresses activation and neurotoxicity of microglia/macrophage in experimental ischemic stroke, *J. Neuroinflammation*, **11**, 26, doi: 10.1186/1742-2094-11-26.
  18. Lee, S., Varvel, N. H., Konerth, M. E., Xu, G., Cardona, A. E., et al. (2010) CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models, *Am. J. Pathol.*, **177**, 2549-2562, doi: 10.2353/ajpath.2010.100265.
  19. Hellwig, S., Brioschi, S., Dieni, S., Frings, L., Masuch, A., et al. (2016) Altered microglia morphology and higher resilience to stress-induced depression-like behavior in CX3CR1-deficient mice, *Brain. Behav. Immun.*, **55**, 126-137, doi: 10.1016/j.bbi.2015.11.008.
  20. Ridderstad Wollberg, A., Ericsson-Dahlstrand, A., Juréus, A., Ekerot, P., Simon, S., et al. (2014) Pharmacological inhibition of the chemokine receptor CX3CR1 attenuates disease in a chronic-relapsing rat model for multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 5409-5414, doi: 10.1073/pnas.1316510111.
  21. Rogers, J. T., Morganti, J. M., Bachstetter, A. D., Hudson, C. E., Peters, M. M., et al. (2011) CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity, *J. Neurosci.*, **31**, 16241-16250, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3667-11.2011.
  22. Boldrini, M., Santiago, A. N., Hen, R., Dwork, A. J., Rosoklija, G. B., et al. (2013) Hippocampal granule neuron number and dentate gyrus volume in antidepressant-treated and untreated major depression, *Neuropsychopharmacology*, **38**, 1068-1077, doi: 10.1038/npp.2013.5.
  23. Gulyaeva, N. V. (2015) Ventral hippocampus, stress and psychopathology: translational implications, *Neurochem. J.*, **9**, 85-94, doi: 10.1134/S1819712415020075.
  24. Maggio, N., and Segal, M. (2012) Steroid modulation of hippocampal plasticity: switching between cognitive and emotional memories, *Front. Cell Neurosci.*, **6**, 12, doi: 10.3389/fncel.2012.00012.
  25. Gulyaeva, N. V. (2019) Functional neurochemistry of the ventral and dorsal hippocampus: stress, depression, dementia and remote hippocampal damage, *Neurochem. Res.*, **44**, 1306-1322, doi: 10.1007/s11064-018-2662-0.
  26. Mahar, I., Bambico, F. R., Mechawar, N., and Nobrega, J. N. (2014) Stress, serotonin, and hippocampal neurogenesis in relation to depression and antidepressant effects, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **38**, 173-192, doi: 10.1016/j.neubiorev.2013.11.009.
  27. Podgorny, O. V., and Gulyaeva, N. V. (2020) Glucocorticoid-mediated mechanisms of hippocampal damage: contribution of subgranular neurogenesis, *J. Neurochem.*, doi: 10.1111/jnc.15265.
  28. Zhang, T. Y., Keown, C. L., Wen, X., Li, J., Vousden, D. A., Anacker, C., et al. (2018) Environmental enrichment increases transcriptional and epigenetic differentiation between mouse dorsal and ventral dentate gyrus, *Nat. Commun.*, **9**, 1-11, doi: 10.1038/s41467-017-02748-x.
  29. Floriou-Servou, A., Ziegler, L., von Stalder, L., Sturman, O., Privitera, M., et al. (2018) Distinct proteomic, transcriptomic, and epigenetic stress responses in dorsal and ventral hippocampus, *Biol. Psychiatry*, **84**, 531-541, doi: 10.1016/j.biopsych.2018.02.003.
  30. Kvichansky, A. A., Volobueva, M. N., Manolova, A. O., Bolshakov, A. P., and Gulyaeva, N. V. (2017) Neonatal proinflammatory stress alters the expression of genes of corticosteroid receptors in the rat hippocampus: septo-temporal differences, *Neurochem. J.*, **11**, 255-258, doi: 10.1134/S1819712417030059.
  31. Kvichansky, A. A., Volobueva, M. N., Manolova, A. O., Bolshakov, A. P., and Gulyaeva, N. V. (2018) The influence of neonatal pro-inflammatory stress on the expression of genes associated with stress in the brains of juvenile rats: septo-temporal specificity, *Neurochem. J.*, **12**, 180-183, doi: 10.1134/s1819712418020083.
  32. Tenk, C. M., Kavaliers, M., and Ossenkopp, K. P. (2008) Sexually dimorphic effects of neonatal immune system activation with lipopolysaccharide on the behavioural response to a homotypic adult immune challenge, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **26**, 331-338, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2008.01.001.
  33. Walker, A. K., Nakamura, T., Byrne, R. J., Naicker, S., Tynan, R. J., et al. (2009) Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis, *Psychoneuroendocrinology*, **34**, 1515-1525, doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.05.010.
  34. Sarkisova, K. Y., Kulikov, M. A., Kudrin, V. S., Midzyanovskaya, I. S., and Birioukova, L. M. (2014) Age-

- related changes in behavior, in monoamines and their metabolites content, and in density of D1 and D2 dopamine receptors in the brain structures of WAG/Rij rats with depression-like pathology, *Zhurn. Vyss. Nervn. Deyatel'nosti Im. I. P. Pavlova*, **64**, 668-685, doi: 10.7868/S0044467714060094.
35. Ma, L., Xu, Y., Wang, G., and Li, R. (2019) What do we know about sex differences in depression: a review of animal models and potential mechanisms, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **89**, 48-56, doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.08.026.
  36. Dobryakova, Y. V., Kasianov, A., Zaichenko, M. I., Stepanichev, M. Y., Chesnokova, E. A., et al. (2018) Intracerebroventricular administration of 192IgG-saporin alters expression of microglia-associated genes in the dorsal but not ventral hippocampus, *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, doi: 10.3389/fnmol.2017.00429.
  37. Paxinos, G., Watson, C., Diego, S., Boston, L., and York, N. (1997) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Academic Press*, available at: <http://www.apnet.com> (accessed on 9 February 2021).
  38. Young, K., and Morrison, H. (2018) Quantifying microglia morphology from photomicrographs of immunohistochemistry prepared tissue using imagej, *J. Vis. Exp.*, **2018**, 57648, doi: 10.3791/57648.
  39. Stepanichev, M. Y., Goryakina, T., Manolova, A., Lazareva, N., Kvichanskii, A., et al. (2021) Neonatal proinflammatory challenge evokes a microglial response and affects the ratio between subtypes of GABAergic interneurons in the hippocampus of juvenile rats: sex-dependent and sex-independent effects, *Brain Struct. Funct.*, **1**, 3, doi: 10.1007/s00429-020-02199-z.
  40. Ramirez, K., Shea, D. T., McKim, D. B., Reader, B. F., and Sheridan, J. F. (2015) Imipramine attenuates neuroinflammatory signaling and reverses stress-induced social avoidance, *Brain. Behav. Immun.*, **46**, 212-220, doi: 10.1016/j.bbi.2015.01.016.
  41. Verboogen, D. R. J., Revelo, N. H., Ter Beest, M., and van der Bogaart, G. (2019) Interleukin-6 secretion is limited by self-signaling in endosomes, *J. Mol. Cell Biol.*, **11**, 144-157, doi: 10.1093/jmcb/mjy038.
  42. Kimura, A., and Kishimoto, T. (2010) IL-6: regulator of Treg/Th17 balance, *Eur. J. Immunol.*, **40**, 1830-1835, doi: 10.1002/eji.201040391.
  43. Hong, M., Zheng, J., Ding, Z.-Y., Chen, J.-H., Yu, L., et al. (2013) Imbalance between Th17 and Treg cells may play an important role in the development of chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice, *Neuroimmunomodulation*, **20**, 39-50, doi: 10.1159/000343100.
  44. Sheridan, G. K., and Murphy, K. J. (2013) Neuron-glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage, *Open Biol.*, **3**, 130181, doi: 10.1098/rsob.130181.
  45. Hughes, P. M., Botham, M. S., Frentzel, S., Mir, A., and Perry, V. H. (2002) Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS, *Glia*, **37**, 314-327, doi: 10.1002/glia.10037.
  46. Bollinger, J. L., Collins, K. E., Patel, R., and Wellman, C. L. (2017) Behavioral stress alters corticolimbic microglia in a sex- and brain region-specific manner, *PLoS One*, **12**, doi: 10.1371/journal.pone.0187631.

## NEONATAL PROINFLAMMATORY STRESS AND EXPRESSION OF GENES ASSOCIATED WITH NEUROINFLAMMATION IN THE HIPPOCAMPUS OF RATS

**A. A. Kvichansky\*, L. V. Tret'yakova, M. N. Volobueva, A. O. Manolova, M. Yu. Stepanichev,  
M. V. Onufriev, Y. V. Moiseeva, N. A. Lazareva, A. P. Bolshakov, and N. V. Gulyaeva**

*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,  
117485 Moscow, Russia; e-mail: al.kvichans@gmail.com*

Differential effect of the neonatal proinflammatory stress (NPS) on the development of neuroinflammation in the hippocampus and induction of the depressive-like behavior in juvenile and adult male and female rats was studied. NPS induction by bacterial lipopolysaccharide in the neonatal period upregulated expression of the *Il6* and *Tnf* mRNAs accompanied by the development of depressive-like behavior in the adult male rats. NPS increased expression of the mRNAs for fractalkine and its receptor in the ventral hippocampus of the juvenile male rats, but did not affect expression of mRNAs for the proinflammatory cytokines and soluble form of fractalkine. NPS downregulated expression of fractalkine mRNA in the dorsal hippocampus of juvenile males. No significant effects of NPS were found in the female rats. Therefore, the NPS induces long-term changes in the expression of neuroinflammation-associated genes in different regions of the hippocampus, which ultimately leads to the induction of neuroinflammation and development of depressive-like behavior in male rats.

**Keywords:** depression, neuroinflammation, cytokines, hippocampus, sex differences



УДК 577.25;616-092.9

## ДЛИТЕЛЬНАЯ СОЦИАЛЬНАЯ ИЗОЛЯЦИЯ ПРИВОДИТ К СНИЖЕНИЮ ЭКСПРЕССИИ ПРЕДШЕСТВЕННИКА BDNF И ПРОЛИЛЭНДОПЕПТИДАЗЫ В СТРУКТУРАХ МОЗГА КРЫС

© 2021 С.Д. Ширенова\*, Н.Н. Хлебникова, Н.А. Крупина

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»,  
125315 Москва, Россия; электронная почта: [Shirenova.jr@gmail.com](mailto:Shirenova.jr@gmail.com)

Поступила в редакцию 29.12.2020

После доработки 25.03.2021

Принята к публикации 15.04.2021

Стресс в раннем периоде развития человека и животных является фактором риска развития нарушений в поведении и когнитивных расстройств. К числу таких стрессирующих воздействий относится социальная изоляция в раннем постнатальном онтогенезе. Развитие нарушений поведения и когнитивных функций связывают с нейропластическими изменениями в структурах мозга. В наших исследованиях показано, что у крыс-самцов Wistar после 10 недель социальной изоляции развиваются нарушения в поведении и когнитивный дефицит, что сопровождается повышением относительного уровня экспрессии гена, кодирующего сериновую протеазу пролилэндопептидазу (PREP, EC 3.4.21.26), во фронтальной коре мозга. Цель настоящей работы заключалась в определении методом иммуноблоттинга уровня белков синаптофизина (SYN), предшественника нейротрофического фактора мозга (proBDNF) и PREP в структурах мозга (гиппокампе, фронтальной коре и стриатуме) крыс, находившихся в длительной социальной изоляции, в сравнении с животными, находившимися на групповом содержании. Работа проведена на 20 крысах (10 самцов, 10 самок) популяции Wistar. Крысы опытной группы (5 самцов и 5 самок) содержали поодиночке в течение 9 мес., начиная с возраста 1 мес. В возрасте 10 мес. у социально изолированных крыс выявлены нарушения памяти в тестах «Условный рефлекс пассивного избегания» и «Водный лабиринт Морриса» и снижение реакции на новизну. Экспрессию белков SYN, proBDNF и PREP в структурах мозга крыс оценивали методом Вестерн-блот с использованием моноклональных антител. Социальная изоляция привела к снижению уровня proBDNF во фронтальной коре мозга у самок и снижению экспрессии PREP в стриатуме у самцов. Полученные данные предполагают участие системы нейротрофических факторов и PREP в механизмах развития поведенческих и когнитивных нарушений, наблюдаемых у крыс в условиях длительной социальной изоляции, начинающейся в раннем возрасте.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** социальная изоляция, синаптофизин, предшественник BDNF, пролилэндопептидаза, структуры мозга, Вестерн-блот.

**DOI:** 10.31857/S0320972521060087

### ВВЕДЕНИЕ

Стресс в раннем онтогенезе является фактором риска развития нарушений в поведении и когнитивных расстройств, ряда соматических заболеваний [1–4]. К числу таких стрессирующих воздействий относится социальная изоляция (депривация) в детском возрасте, сопровождающаяся ограничением сенсорной стимуляции и недостаточностью формирования со-

циальных, когнитивных и речевых навыков в критические периоды развития.

Социальная изоляция (СИ) является существенным стрессором как для человека, так и для социальных животных, к которым относятся и грызуны [5, 6]. Сообщается о развитии у социально изолированных крыс признаков повышенной агрессивности, нарушений мотивации, гиперактивного фенотипа, когнитивного дефицита [7]. Считается, что нейробиологической основой этих сдвигов в поведении являются нейропластические изменения в структурах мозга [8] и нарушения эпигенетического программирования активности генома в раннем возрасте [9–11].

К фундаментальным компонентам нейропластичности относится пластичность синаптических связей, изменение которых зависит в

Принятые сокращения: ВЛМ – тест «Водный лабиринт Морриса»; ГП – гиппокамп; ОП – тест «Открытое поле»; СИ – социальная изоляция; СТР – стриатум; УРПИ – тест «Условный рефлекс пассивного избегания»; ФК – фронтальная кора; BDNF – brain-derived neurotrophic factor (нейротрофический фактор мозга); PREP – пролилэндопептидаза; SYN – синаптофизин.

\* Адресат для корреспонденции.

первую очередь от активности нейронов; эти процессы, в свою очередь, определяются регулирующей синаптических белков [12]. Основным интегральным белком мембран малых (не содержащих пептидов) синаптических везикул нейронов является трансмембранный гликопротеин синаптофизин (SYN), к функциям которого относят формирование синаптических пузырьков, выделение из них нейромедиаторов и синаптогенез [13, 14]. Данные о влиянии разных видов хронического стресса (иммобилизационный, непредсказуемый, стресс отлучения новорождённых крысят от матери) на экспрессию SYN противоречивы [15–21], что может быть обусловлено как особенностями самого стрессогенного воздействия, так и особенностями реагирования на стресс животных разных линий, пола и возраста. Данных по эффектам стресса СИ немного, и они также неоднозначны. Хронический 8-недельный стресс СИ взрослых самок Sprague-Dawley не изменял экспрессии SYN в гиппокампе (ГП) и гипоталамусе [22], а 8-недельный стресс СИ самцов крыс *Lister hooded*, начинавшийся сразу после отлучения крысят от матери, приводил к снижению экспрессии SYN в зубчатой извилине ГП [23]. Двухнедельная СИ взрослых самцов крыс Sprague-Dawley приводила к снижению экспрессии SYN и синаптической пластичности в ГП [24]. Нам не удалось найти в научной литературе данных об экспрессии SYN в структурах мозга крыс при пролонгированной СИ.

Ещё одним хорошо известным маркером и регулятором синаптической и нейрональной пластичности является BDNF – самый распространённый нейротрофин в мозге млекопитающих, который относят к наиболее важным медиаторам стресс-ответа [25, 26]. BDNF регулирует выживаемость нейронов и их дифференцировку, модулирует синаптическую функцию (способствует долговременной потенциации, структурному увеличению шипиков дендритов) [27]. BDNF первоначально синтезируется в форме *pre-proBDNF*-предшественника в эндоплазматическом ретикулуме, транспортируется в аппарат Гольджи, где образуется изоформа *proBDNF*, из которой после отщепления последовательности *pro*-домена образуется зрелый BDNF (*mBDNF*) [28, 29]. Регулирующее действие *proBDNF* и самого BDNF на синаптическую пластичность отличается, часто противоположно. Предполагается, что *proBDNF* может быть ключевым регулятором синаптической пластичности и формирования нервных цепей в подростковом возрасте, а эффекты сохраняются у взрослых животных [27]. Нарушение баланса *proBDNF* и *mBDNF*, предполагающее торможе-

ние конверсии предшественника до зрелого BDNF, обнаружено в ГП крыс на модели стресса «двойного удара» (хроническое неонатальное отлучение от матери и питьё раствора кортикостерона взрослыми животными) [30] и на модели пренатального стресса [31]. Ранняя СИ, начинавшаяся сразу после отлучения от матери и продолжавшаяся 2 недели (постнатальные дни 21–34), приводила к снижению предстимульного торможения в тесте на сенсомоторную реактивность и эпигенетическим модификациям BDNF: увеличению экспрессии BDNF в медиальной префронтальной коре и снижению его экспрессии в ГП у самцов крыс Sprague-Dawley [32]. Данных о том, изменяется ли уровень изоформ BDNF при стрессе длительной СИ, и, если да, то как, в настоящее время нет.

В наших исследованиях на модели СИ, начинавшейся сразу после отлучения крысят от матери и длившейся 2 мес., крысы-самцы Wistar демонстрировали повышенную агрессивность, снижение предстимульного торможения и когнитивный дефицит, проявлявшийся нарушением привыкания, о котором судили по снижению амплитуды акустического стартл-ответа; это сопровождалось повышением во фронтальной коре (ФК) мозга относительного уровня экспрессии гена *prep*, кодирующего сериновую протеазу пролилэндопептидазу (PREP, EC 3.4.21.26) [33]. PREP, протеаза с плейотропным действием [34], вовлечена во многие процессы, в том числе в процессы обучения и памяти, нейропластичности, по-видимому, вследствие взаимодействия с другими белками [35]. На модели смешанного тревожно-депрессивного состояния, индуцированного действием одного из ингибиторов дипептидилпептидазы IV (EC 3.4.14.5) в раннем постнатальном периоде, у крыс-самцов Wistar с возрастом показано повышение активности PREP в ФК, гипоталамусе, прилежащем ядре и стриатуме (СТР), у крыс-самок – в ГП и СТР [36]. У этих крыс обучение в тесте условного рефлекса активного избегания проходило хуже, чем у животных контрольной группы [37]. Тревно-депрессивное состояние, индуцированное неонатальным действием другого ингибитора дипептидилпептидазы IV, сопровождалось повышением экспрессии гена *prep* в СТР [38]. На моделях экспериментальной ретроградной амнезии, вызванной действием м-холиноблокатора скополамина или максимальным электрошоком, активность PREP в ФК и ГП самцов Wistar возрастала [39]. Недавно мы показали, что длительная СИ крыс Wistar, начинавшаяся после отлучения от матери и длившаяся 9 мес., ухуд-

шала когнитивные способности самцов и самок крыс в тестах условного рефлекса пассивного избегания и пространственной памяти, причём эффект был более выражен у самок [40].

Цель настоящей работы заключалась в определении методом иммуноблоттинга уровня белков SYR, proBDNF и PREP в структурах мозга (гиппокампе, фронтальной коре и стриатуме) крыс, находившихся в длительной социальной изоляции, в сравнении с животными, которых содержали в группах.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Моделирование социальной изоляции и оценка поведения крыс.** Оценка экспрессии белков SYR, proBDNF и PREP проведена на 20 крысах (10 самцов, 10 самок) популяции Wistar, рождённых и выращенных в питомнике ФГБНУ «НИИОПП» (система «Меркурий», номер в реестре: RU 1487336). Эти животные были отобраны из больших по объёму групп самцов и самок крыс Wistar, содержащихся в социальной изоляции или в группах в течение 9 мес. и прошедших поведенческое тестирование. У отобранных крыс масса каждого из образцов ткани выделенных структур мозга была не менее 100 мг, что необходимо для проведения анализа методом иммуноблоттинга без потери его чувствительности. Результаты оценки поведения в исходных больших группах крыс в тестах «Открытое поле» (ОП), «Условный рефлекс пассивного избегания» (УРПИ) и «Водный лабиринт Морриса» (ВЛМ) опубликованы [40]. В настоящей работе мы также провели оценку поведения в данных тестах у крыс, отобранных в эксперимент по определению уровня экспрессии белков в мозге, для того чтобы определить, насколько поведение животных в этой выборке отражает выявленные ранее изменения в поведении животных в больших группах. Начиная с возраста 1 мес. и до выведения животных из эксперимента в возрасте 10 мес., часть крыс содержали в группах по 4–5 животных в клетках размером 57,0 × 37,0 × 19,0 см (группы «Контроль, самки»,  $n = 5$  и «Контроль, самцы»,  $n = 5$ ), часть – поодиночке в клетках размером 36,5 × 20,5 × 14,0 см (группы «Изоляция, самки»,  $n = 5$  и «Изоляция, самцы»,  $n = 5$ ). Животных содержали в стандартных условиях вивария с естественной сменой освещённости и свободным доступом к пище (ООО «Лабораторкорм», Россия) и воде.

Перед выведением крыс из эксперимента оценивали двигательную активность и память животных в тестах автоматизированного ОП,

классического ОП, УРПИ и ВЛМ. Подробное описание процедур тестирования приведено в работе Kgrupina et al. [40].

**Тест автоматизированного «Открытого поля» (оценка двигательной активности).** В автоматизированном ОП (аОП) с прозрачными стенками (арена размером 48 × 48 × 21 см) (Opto-Varimex, «Columbus Instruments», США) двигательную активность крыс оценивали в течение 10 мин при мягком комнатном освещении (17 люкс) в условных см (по числу прерываний инфракрасных лучей).

**Тест классического «Открытого поля» (оценка двигательной активности и реакции на новизну).** В классическом ОП (кОП) (круглая белая арена диаметром 120 см разделена на 20 квадратов, высота непрозрачных стенок 28 см) двигательную активность крыс оценивали в течение трёх минут по числу пересечённых квадратов при ярком освещении (500–510 люкс в центре, 400–410 люкс на периферии ОП). На четвертой минуте белый свет переключали на мягкий красный (лампочка 40 Вт над центром ОП). Реакцию на новизну определяли по увеличению двигательной активности животных в ответ на изменение окружающей среды [41]; фактором новизны в данном случае служила резкая смена освещённости. Рассчитывали отношение: (путь, пройденный за четвертую минуту при красном свете)/(путь, пройденный за первую минуту при белом свете).

**Тест «Условный рефлекс пассивного избегания».** Выработку УРПИ проводили в установке, разделённой опускающейся дверцей на «безопасный» освещённый и «опасный» (с электрифицированным полом) неосвещённый отсеки. Установку помещали в звукоизолированную камеру (Multi Conditioning System, «TSE Systems», Германия). В первый день крысы привыкали к установке, исследуя светлый (156 люкс) отсек в течение 60 с, и затем в течение 120 с получали возможность посетить тёмный отсек. Через 24 ч проводили выработку УРПИ (этап обучения): крысу помещали в освещённый отсек установки, через 5 с разделительную дверцу автоматически открывали, а через 1 с после перехода животного в неосвещённый отсек – закрывали; через 5 с крыса получала удар током (0,5 мА, 1 Hz, в течение 5 с); через 30 с после этого крысу возвращали в клетку. Сохранение УРПИ проверяли через 24 ч после выработки (Тестирование 1) и через неделю (Тестирование 2). На всех этапах фиксировали латентный период перехода из освещённого отсека установки в неосвещённый отсек (с). Процедура проверки была аналогичной процедуре выработки УРПИ за исключением того, что электрический ток при переходе в тёмный отсек

не подавали. Максимально возможное время для перехода в тёмный отсек составляло 300 с.

**Тест «Водный лабиринт Морриса» (оценка пространственной памяти).** Установка ВЛМ представляла собой бассейн круглой формы диаметром 160 см, заполненный водой до высоты 30 см; температура воды составляла  $25 \pm 1$  °C; поведение крыс фиксировали с помощью программного обеспечения (Video tracking system VideoMot2, «TSE Systems»). Пространство бассейна было виртуально разделено на 4 квадранта. Во время обучения прозрачную платформу диаметром 14 см располагали в одном и том же квадранте (целевой квадрант) так, чтобы она находилась на 1,5 см ниже уровня воды. Визуальные ключи располагали вне бассейна. Крыс начинали обучать в возрасте 5,5 мес. В течение четырёх последовательных дней крысе предоставляли 4 попытки найти скрытую платформу, стартовые квадранты чередовали в псевдослучайном порядке. Максимальная длительность попытки составляла 2 мин. Выработку навыка проверяли в двухминутной пробе через 24 ч после последнего дня обучения; платформу из лабиринта убрали. Проверку сохранения навыка проводили в тех же условиях через 4 мес. после обучения – у крыс в возрасте 9,5 мес. На следующий день после проверки крысе предоставляли 2 попытки (максимальная длительность – 2 мин) с напоминанием места расположения платформы, которую вновь помещали в целевой квадрант. Через сутки проводили третью проверку сохранения навыка при отсутствии платформы в бассейне. В пробах анализировали латентность достижения зоны платформы и зоны, прилегающей к платформе (10 см от края платформы), относительное время, проведённое в краевой зоне (дистальные 20% от радиуса бассейна). В настоящей работе даны результаты сравнения всех групп крыс в последней проверке, перед выведением животных из эксперимента.

В возрасте 10 мес. всех крыс декапитировали с использованием гильотины.

**Подготовка проб.** После декапитации крыс мозг быстро извлекали и помещали в охлаждённый физиологический раствор. На ледяной подложке выделяли гиппокамп, фронтальную кору и стриатум; до окончания сбора всех проб образцы помещали в жидкий азот, в дальнейшем пробы хранили в морозильнике Sanio MDF-193 («Sanio», Япония) при  $-80$  °C. Пробы растирали в жидком азоте. Для получения цитозольного экстракта использовали 2 лизис-буфера: гипотонический буфер-I [рН 7,5, 20 mM Tris, «Bio-Rad», США), 1 mM EDTA («Sigma-Aldrich», США), 1 mM DTT («Bio-Rad»), протеазный ин-

гибиторный микс 10 мкл/мл («Sigma-Aldrich») и лизис-буфер-II [60 mM HEPES, 150 mM NaCl, 2 mM EGTA, 1% (w/v) Triton X-100, 10% (v/v) глицерин, 1 mM DTT, протеазный ингибиторный микс 10 мкл/мл; («Sigma-Aldrich»)]. Пробы лизировали в гипотоническом буфере-I в течение 5 мин при 4 °C, затем супернатант отделяли при помощи центрифугирования [1000 об./мин, 5 мин, 4 °C («Eppendorf», Германия)]. Лизис буфером-II проводили в течение 25 мин при 4 °C, затем пробы повторно центрифугировали [13 000 об./мин, 25 мин, 4 °C; («Eppendorf»)]. В цитоплазматический экстракт, содержащий исследуемые белки, добавляли загрузочный буфер [0,5 M Tris-HCl, рН 6,8, 0,08 г/мл SDS, 5 мг/мл DTT, 0,2 мг/мл бромфеноловый синий, 40% (v/v) глицерин] в соотношении 3/1 и инкубировали в течение 5 мин при 95 °C, далее образцы хранили при  $-80$  °C.

**Определение экспрессии белков SYP, proBDNF и PREP методом иммуноблоттинга.** Концентрацию общего белка в образцах определяли спектрофотометрически по методу Бредфорда [42]. В каждую лунку 8%-ного (w/v) полиакриламидного разрешающего геля загружали подготовленные образцы всех исследованных белков (140 мкг общего белка/проба) и проводили электрофорез 120 V, 90 мин), после чего разделённые образцы переносили на целлюлозную мембрану («Bio-Rad») при помощи электроосмоса (100 V, 60 мин). Блокирование неспецифического связывания антител проводили путём погружения мембраны в 5%-ный раствор обезжиренного молока в PBS («Bio-Rad»), содержащий 0,1% (v/v) Tween 20 и 0,02% азид Na, на 1 ч при 4 °C. Одновременно с этим первичные моноклональные антитела мыши к SYP (2): sc-136271, 38–48 кДа, антитела мыши к proBDNF (5H8): sc-65514, 32 кДа, антитела мыши к PREP (C-12): sc-365416, 80 кДа и антитела мыши к  $\beta$ -Actin (C4): sc-47778, 43 кДа («Santa Cruz Biotechnology Inc.», США) были преинкубированы при 4 °C в растворе молока (5% обезжиренного молока, 0,1% (v/v) Tween 20 и 0,02% азид Na в PBS). Затем мембрану инкубировали в растворе первичных антител ещё 15 ч при 4 °C. После промывания блоты в течение 60 мин инкубировали в растворе вторичных антител (goat anti-mouse IgG-HRP: ab6789 («Abcam», США) при 4 °C. Белки выявляли при помощи ECL-реагента («Pierce Biotechnology», США). Затем мембрану помещали под фотоплёнку («Kodak», США) на 10 мин. Для денситометрии полученных результатов использовали программу Adobe Photoshop 7.0 («Adobe Systems», США). Результаты приведены в относительных денситометрических единицах (ОДЕ). Помимо оценки

концентрации белка в образцах по методу Брэдфорда, в качестве дополнительного контроля равномерности загрузки проб производили окрашивание нитроцеллюлозной мембраны на общий белок (Ponceau S) и измеряли экспрессию  $\beta$ -актина (белок внутреннего контроля).

**Статистическая обработка результатов.** Использовали алгоритмы программы Statistica 12.0. Проверка по тесту Шапиро–Уилка не подтвердила соответствия распределения эмпирических данных нормальному закону по ряду показателей в небольших по объёму группах. На этом основании статистический анализ по всем показателям был проведён с помощью непараметрического двустороннего  $U$ -критерия Манна–Уитни для независимых переменных. Принятый уровень значимости составлял 5%. Для поправки на множественность сравнений рассчитывали критическое значение  $p$  ( $p_{кр}$ ) по методу FDR-контроля [43]. Соотношение  $p_{кр} < p < 0,05$  рассматривали как выраженную тенденцию, соотношение  $0,05 < p < 0,06$  – как тенденцию. Дополнительно рассчитывали размер эффекта (Effect size, ES). Использовали индексы оценочной статистики  $\eta^2$  (объяснённая дисперсия для выборки) и  $d_{Cohen}$  (Cohen's  $d$ , стандартизированная мера эффекта) [44]. Применяли следующую интерпретацию размера эффекта  $d_{Cohen}$ : 0,20–0,40 – ES маленький, 0,50–0,70 – средний, от 0,80 и выше – большой;  $\eta^2$ : 0,010–0,039 – маленький, 0,060–0,110 – средний, 0,140–0,200 – большой [45].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

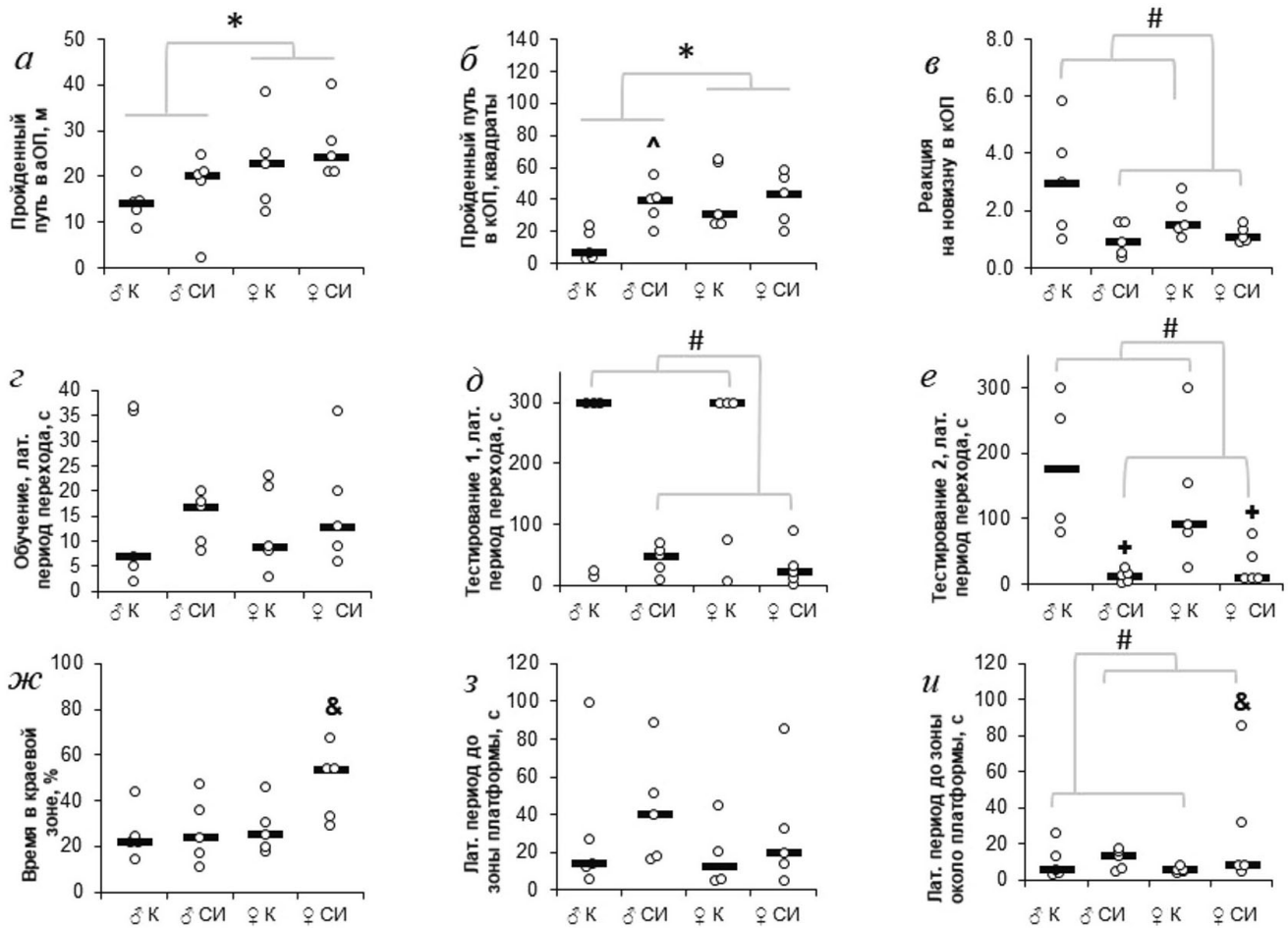
**Оценка поведения крыс. Тест автоматизированного «Открытого поля».** Двигательная активность всех самок (содержавшихся в группах и изолированно) превышала двигательную активность всех самцов (содержавшихся в группах и изолированно) ( $U = 18,0$ ;  $p = 0,015$ ;  $\eta^2 = 0,293$ ;  $d_{Cohen} = 1,286$ ) (рис. 1, а), однако двигательная активность всех крыс-изолянтов (самцы + самки) не отличалась от величины показателя у всех крыс, содержащихся в группах ( $U = 34,0$ ;  $p = 0,247$ ). Статистически значимых различий по данному показателю между крысами одного пола, содержащимися в изоляции и в группах, не выявлено.

**Тест классического «Открытого поля».** В этом тесте также двигательная активность у всех самок была выше, чем у всех самцов ( $U = 23,5$ ;  $p = 0,043$ ;  $\eta^2 = 0,201$ ;  $d_{Cohen} = 1,002$ ), причём это различие было обусловлено вкладом крыс, содержащихся в группах, а не в изоляции [ $U = 0,0$ ;  $p = 0,008$  ( $p_{кр} = 0,013$ );  $\eta^2 = 0,682$ ;

$d_{Cohen} = 2,928$ ] (рис. 1, б). У крыс, находившихся на изолированном содержании (самцы + самки), двигательная активность не отличалась от двигательной активности крыс, содержащихся в группах (самцы + самки) ( $U = 29,0$ ;  $p = 0,123$ ). Однако выявлено статистически значимое увеличение двигательной активности у самцов, содержащихся в изоляции, по сравнению с самцами, содержащимися в группах [ $U = 1,0$ ;  $p = 0,016$  ( $p_{кр} = 0,025$ );  $\eta^2 = 0,577$ ;  $d_{Cohen} = 2,336$ ]. У крыс, содержащихся в изоляции (самцы + самки), реакция на новизну была снижена по сравнению с крысами, которых содержали в группах ( $U = 18,0$ ;  $p = 0,015$ ;  $\eta^2 = 0,293$ ;  $d_{Cohen} = 1,286$ ) (рис. 1, в). Не выявлено различий в реакции на новизну в зависимости от пола крыс.

**Тест УРПИ.** На этапе обучения латентный период перехода в тёмный отсек установки в группах не различался (рис. 1, г). Через сутки после обучения снижение длительности латентного периода перехода в тёмный отсек у крыс-изолянтов (самцы + самки) по сравнению с животными, находившимися на групповом содержании (самцы + самки), было статистически значимым:  $U = 23,0$ ;  $p = 0,043$ ;  $\eta^2 = 0,208$ ;  $d_{Cohen} = 1,026$ ) (рис. 1, д). На этапе проверки памяти через неделю после первого тестирования латентный период перехода в тёмный отсек установки у крыс-изолянтов (самцы + самки) также был ниже, чем у крыс, содержащихся в группах (самцы + самки):  $U = 2,5$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,645$ ;  $d_{Cohen} = 2,694$ ) (рис. 1, е). Выявлена выраженная тенденция к уменьшению длительности латентного периода перехода в тёмный отсек как у самцов, находившихся на изолированном содержании, по сравнению с самцами, содержащимися в группах [ $U = 0,0$ ;  $p = 0,016$  ( $p_{кр} = 0,013$ );  $\eta^2 = 0,682$ ;  $d_{Cohen} = 2,928$ ], так и у самок, находившихся на изолированном содержании, по сравнению с самками контрольной группы [ $U = 2,0$ ;  $p = 0,032$  ( $p_{кр} = 0,025$ );  $\eta^2 = 0,481$ ;  $d_{Cohen} = 1,926$ ]. На всех этапах проверки памяти не выявлено различий по длительности латентного периода перехода в тёмный отсек установки у крыс разного пола, находившихся в одних и тех же условиях содержания.

**Тест «Водный лабиринт Морриса».** Все крысы, которых содержали поодиночке (самцы + самки), не отличались от всех крыс, содержащихся в группах, по относительному времени, проведённому в краевой зоне лабиринта:  $U = 31,0$ ;  $p = 0,165$ . Не выявлено статистически значимых различий по данному показателю при сравнении всех самок (содержавшихся в группах и изолированно) со всеми самцами:  $U = 27,0$ ;  $p = 0,089$ . Однако у самок, находив-



**Рис. 1.** Показатели двигательной активности, обучения и памяти у крыс, находившихся в условиях длительной социальной изоляции (СИ), и контрольных животных (К) в возрасте 9–10 мес. В каждой группе  $n = 5$ . Тест автоматизированного «Открытого поля» (аОП) (а) – двигательная активность, суммарно за 10 мин; тест классического «Открытого поля» (кОП) (б) – двигательная активность, суммарно за 3 мин; в – реакция на новизну; тест «Условный рефлекс пассивного избегания» (г) – латентный период перехода в темный отсек камеры на стадии обучения; д – тот же показатель на стадии проверки сохранности памяти через 24 ч после обучения (Тестирование 1); е – через неделю после первой проверки (Тестирование 2); тест «Водный лабиринт Морриса» (ж) – относительное время, проведённое в краевой зоне лабиринта; з – латентный период достижения зоны платформы; и – латентный период достижения зоны, прилегающей к платформе (обозначение по вертикальной оси – зона около платформы). \*  $p < 0,05$  – Статистически значимые различия между всеми самцами и всеми самками; #  $p < 0,05$  – статистически значимые различия между всеми крысами, находившимися на изолированном содержании, и всеми крысами, которых содержали в группах; ^  $p < 0,05$  – по сравнению с самцами, содержащимися в группах; +  $p_{кр} < p < 0,05$  – по сравнению с животными того же пола, находившимися на групповом содержании; &  $0,05 < p < 0,06$  – по сравнению с самками, находившимися на групповом содержании (U-критерий Манна–Уитни с поправкой на множественность сравнений по методу FDR-контроля)

шихся в длительной изоляции, по сравнению с самками, содержащимися в группах, обнаружена тенденция к увеличению этого показателя (рис. 1, ж):  $U = 3,0$ ;  $p = 0,056$ ;  $\eta^2 = 0,394$ ;  $d_{Cohen} = 1,612$ .

Различий по длительности латентного периода достижения зоны платформы между всеми крысами, содержащимися в изоляции и в группах, а также между всеми самцами и самками не было обнаружено (рис. 1, з).

Крысы, содержащиеся изолированно (самцы + самки), достигали зоны, прилегающей к

платформе, позже крыс, содержащихся в группах (самцы + самки):  $U = 22,0$ ;  $p = 0,035$ ;  $\eta^2 = 0,224$ ;  $d_{Cohen} = 1,075$ . По данным, приведённым на рис. 1, и, видно, что у некоторых самок-изолянтов был значительно увеличен латентный период достижения зоны, прилегающей к платформе. Однако статистический анализ выявил только тенденцию к увеличению этого показателя у самок, находившихся в изоляции, по сравнению с контрольным значением у самок, содержащихся в группах:  $U = 3,0$ ;  $p = 0,056$ ;  $\eta^2 = 0,394$ ;  $d_{Cohen} = 1,612$ .

**Экспрессия белков SYP, proBDNF и PREP в структурах мозга.** В ГП экспрессия SYP, proBDNF и PREP у крыс-изолянтов не отличалась от экспрессии этих белков у животных того же пола, которых содержали в группах (рис. 2, *a* (1 и 2), *б* и *в*; рис. 3, *a* (1 и 2), *б* и *в*; рис. 4, *a* (1 и 2), *б* и *в*). Просматриваемое различие в содержании SYP у самцов, которых содержали поодиночке и в группах (рис. 2, *б*), не достигло уровня статистической значимости:  $U = 5,0$ ;  $p = 0,151$ ;  $\eta^2 = 0,245$ ;  $d_{\text{Cohen}} = 1,141$ .

В ФК была обнаружена тенденция к снижению экспрессии SYP у самцов, находившихся в изоляции, по сравнению с самцами, содержащимися в группах (рис. 2, *a* (3), *з*):  $U = 3,0$ ;  $p = 0,056$ ;  $\eta^2 = 0,394$ ;  $d_{\text{Cohen}} = 1,612$ . Экспрессия proBDNF у самок, находившихся на изолированном содержании, была статистически значимо снижена по сравнению с экспрессией белка у самок, которых содержали в группах (рис. 3, *a* (4), *д*):  $U = 2,0$ ;  $p = 0,032$ ;  $\eta^2 = 0,481$ ;  $d_{\text{Cohen}} = 1,926$ . Как у самцов, так и у самок крыс, находившихся в изоляции, экспрессия PREP не отличалась от экспрессии белка у животных, которых содержали в группах (рис. 4, *a* (3 и 4), *г* и *д*).

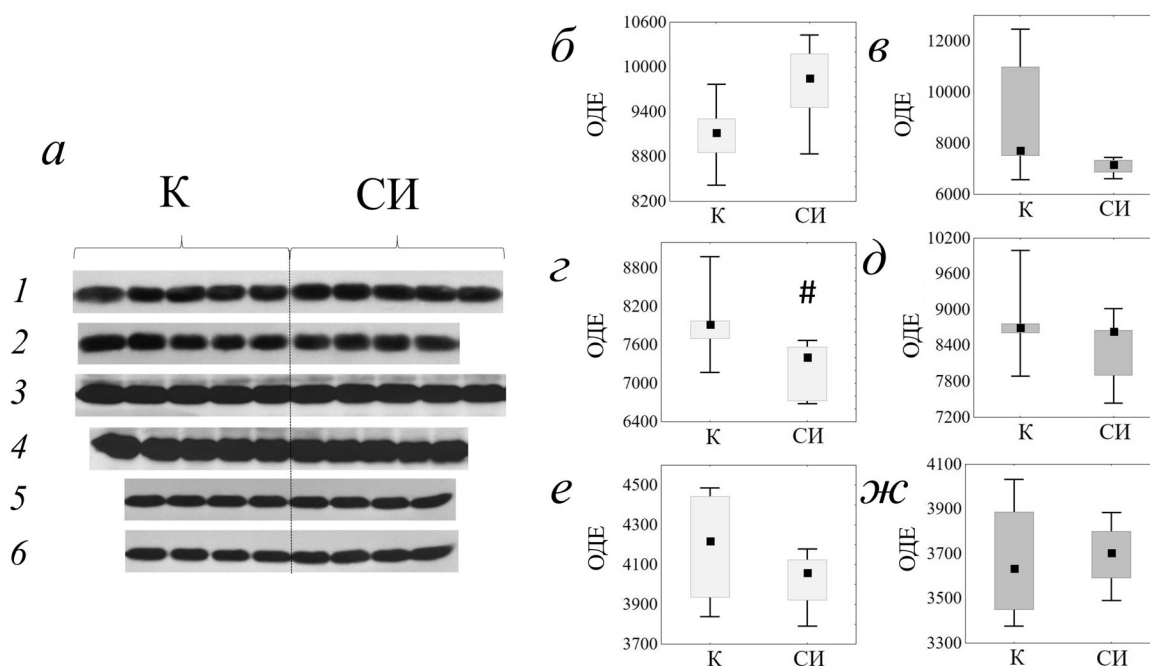
В СТР экспрессия PREP у самцов, которых содержали в изоляции, была статистически зна-

чительно меньшей, чем у самцов, которых содержали в группах (рис. 4, *a* (5), *е*):  $U = 0,0$ ;  $p = 0,029$ ;  $\eta^2 = 0,667$ ;  $d_{\text{Cohen}} = 2,828$ . У самок, находившихся на изолированном содержании, наблюдалась тенденция к снижению экспрессии PREP (рис. 4, *a* (6), *ж*):  $U = 1,0$ ;  $p = 0,057$ ;  $\eta^2 = 0,51$ ;  $d_{\text{Cohen}} = 2,042$ . Отличий в содержании SYP и proBDNF у крыс одного и того же пола, содержащихся в социальной изоляции и в группах, в СТР не выявлено.

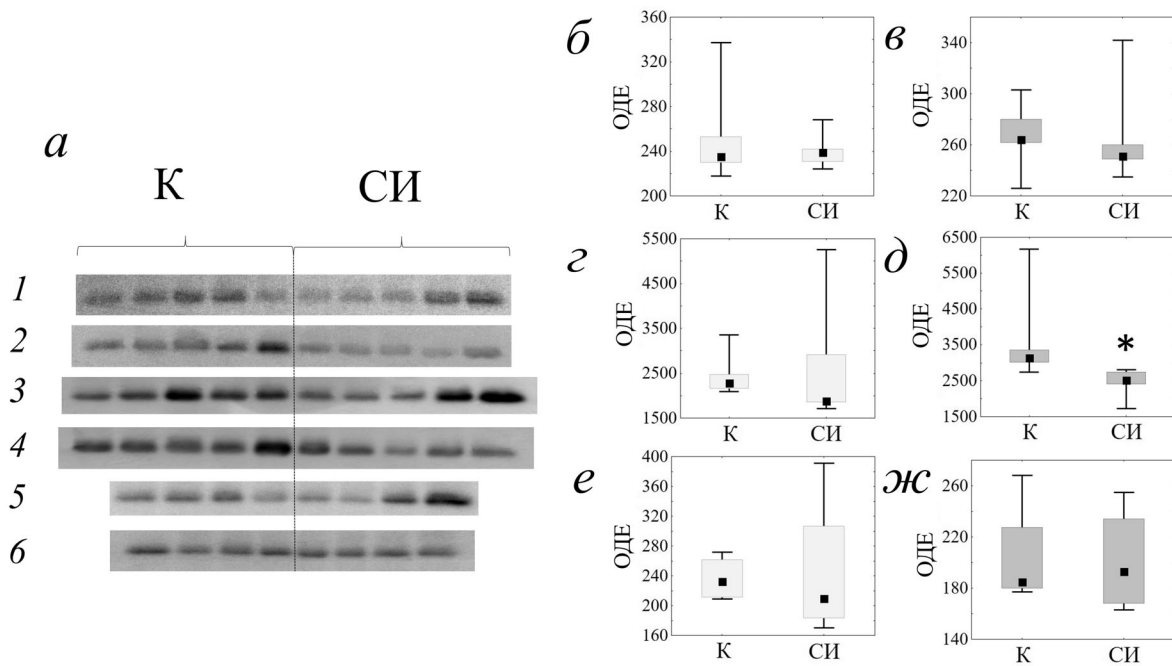
Статистически значимых различий в экспрессии  $\beta$ -актина в структурах мозга крыс, которых содержали в группах или в социальной изоляции, не обнаружено. Результаты анализа уровня  $\beta$ -актина в структурах мозга методом иммуноблоттинга и примеры проявленных плёнок и окрашенных на общий белок мембран с маркерами молекулярных масс представлены на рис. S1 и S2 в Приложении.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

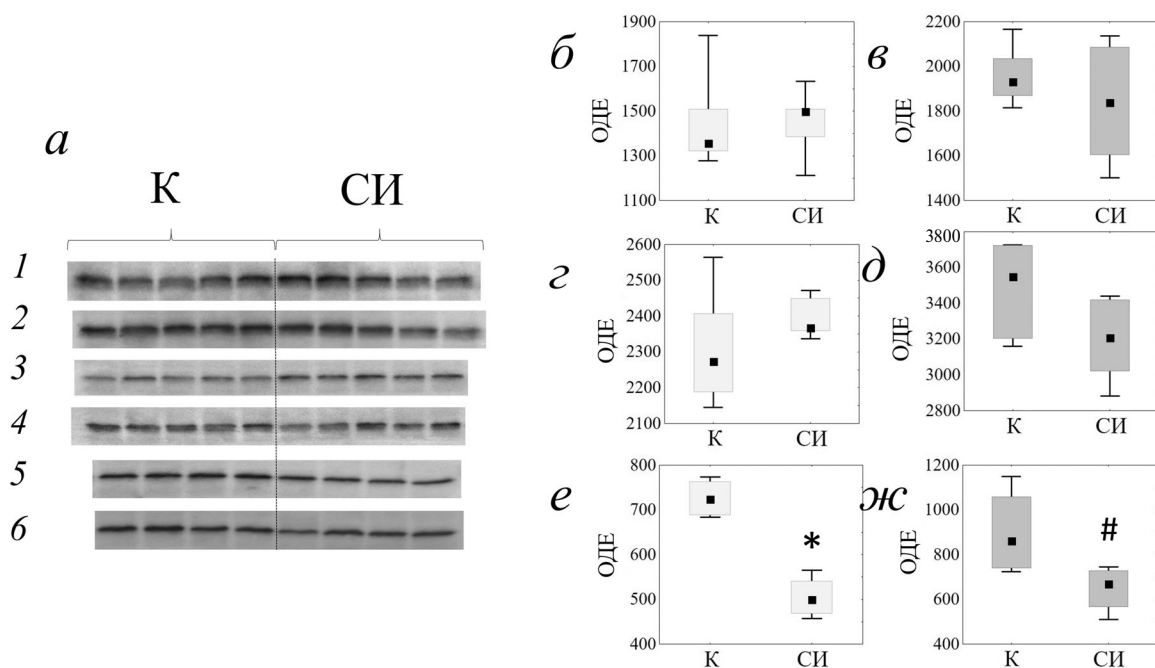
В настоящей работе анализ поведения на использованной выборке крыс ( $n = 20$ ) выявил более высокую двигательную активность у самок по сравнению с самцами в двух тестах ОП. Реак-



**Рис. 2.** Результаты анализа уровня SYP методом иммуноблоттинга (*a*) ГП самцов (1), ГП самок (2), ФК самцов (3), ФК самок (4), СТР самцов (5) и СТР самок (6). *б–ж* – Уровень экспрессии SYP в структурах мозга крыс, содержащихся в течение 9 мес. в социальной изоляции (СИ) или в контрольных группах (К): ГП самцы (*б*), ГП самки (*в*), ФК самцы (*з*), ФК самки (*д*), СТР самцы (*е*), СТР самки (*ж*). На блочной диаграмме нижняя сторона блока – Q1 (первый квартиль), верхняя сторона блока – Q3 (третий квартиль), квадратиком в блоке отмечена медиана – Q2 (второй квартиль), высота блока – интерквартильный размах. ОДЕ – относительные денситометрические единицы.  $0,05 < p < 0,06$  сравнение с крысами того же пола, находившимися на групповом содержании (двусторонний  $U$ -критерий Манна–Уитни)



**Рис. 3.** Результаты анализа уровня proBDNF методом иммуноблоттинга (а) ГП самцов (1), ГП самок (2), ФК самцов (3), ФК самок (4), СТР самцов (5), СТР самок (6). б–ж – Уровень экспрессии proBDNF в структурах мозга крыс, содержащихся в течение 9 мес. в социальной изоляции (СИ) или в контрольных группах (К): ГП самцы (б), ГП самки (в), ФК самцы (г), ФК самки (д), СТР самцы (е), СТР самки (ж). ОДЕ – относительные денситометрические единицы. \*  $p < 0,05$  – сравнение с крысами того же пола, находившимися на групповом содержании (двусторонний  $U$ -критерий Манна–Уитни)



**Рис. 4.** Результаты анализа уровня PREP методом иммуноблоттинга (а) ГП самцов (1), ГП самок (2), ФК самцов (3), ФК самок (4), СТР самцов (5), СТР самок (6). б–ж – Уровень экспрессии PREP в структурах мозга крыс, содержащихся в течение 9 мес. в социальной изоляции (СИ) или в контрольных группах (К): ГП самцы (б), ГП самки (в), ФК самцы (г), ФК самки (д), СТР самцы (е), СТР самки (ж). ОДЕ – относительные денситометрические единицы. \*  $p < 0,05$ ; #  $p < 0,06$  – сравнение с крысами того же пола, находившимися на групповом содержании (двусторонний  $U$ -критерий Манна–Уитни)



ция на новизну в классическом ОП у крыс, содержащихся ~8 мес. в изоляции, была снижена независимо от пола. Эти данные принципиально схожи с данными, полученными в указанных тестах на больших группах крыс Wistar (размер всей выборки  $n = 69$ ), подвергнутых социальной изоляции той же длительности [40]. Результаты оценок когнитивных функций в тестах УППИ и ВЛМ также свидетельствуют о сходной направленности нарушений у крыс из малой и большой выборки: независимо от пола СИ приводила к ухудшению пассивного избегания и пространственной памяти (по показателю длительности латентного периода достижения зоны, прилежащей к платформе) (рис. S3 в Приложении). Полученные данные позволяют говорить о том, что малая выборка крыс, на которой оценивали уровень белков – маркёров нейропластичности и PREP в структурах мозга, по характеру нарушений поведения животных достаточно хорошо представляет исходную большую группу крыс, подвергнутых длительной социальной изоляции.

В настоящем исследовании снижение уровня proBDNF было выявлено только у самок, которых содержали поодиночке, и только в ФК. Результаты, полученные в тесте на пространственную память в ВЛМ на малой выборке, дают основание предполагать, что в условиях хронического стресса СИ память у самок может быть хуже, чем у групповых крыс и у изолированных самцов (рис. 1, *ж* и *и*). Это предположение согласуется с заключением, сделанным в нашем недавнем исследовании на большой выборке крыс: в условиях длительной социальной изоляции, начинавшейся в раннем возрасте, у самок крыс по сравнению с самцами когнитивные нарушения в парадигме ВЛМ более выражены, что может указывать на бóльшую уязвимость самок к стрессу длительной СИ [40]. В работе Marco et al. [46] показано, что ухудшение распознавания нового объекта, выявленное у самок, но не у самцов крыс, подвергнутых стрессу суточной депривации от матери в раннем постнатальном периоде, не сопровождалось различиями в снижении уровня экспрессии BDNF в ФК и ГП у крысят разного пола в подростковом возрасте. Однако надо принять во внимание тот факт, что мы оценивали экспрессию не зрелого BDNF, а только его предшественника, регулирующего синаптическую пластичность и формирование нервных связей в подростковом возрасте [27]. Результаты настоящего исследования поддерживают гипотезу о том, что разнообразие функций нейротрофинов может частично модулироваться регулируемым высвобождением зрелых и про-изоформ в нерв-

ной системе [47]. Возможно, снижение proBDNF в ФК у 10-месячных самок крыс отражает нейропластические изменения, возникшие в раннем периоде развития, когда животные уже находились в условиях социальной изоляции. Если такие изменения сопровождались дисбалансом proBDNF/mBDNF, то это могло быть одним из механизмов, лежащих в основе большей уязвимости самок к стрессу длительной СИ, начинавшейся в раннем возрасте. Есть свидетельства того, что функционирование сигнального каскада proBDNF–p75NTR в нейронах взрослых мышей тормозило активность пирамидных клеток V-слоя энторинальной коры ГП, возбуждение которых является ключевым компонентом рабочей и пространственной памяти [48]. Блокировка proBDNF антителами усиливала возбудимость пирамидных нейронов ГП.

В ряде работ обнаружено, что когнитивные нарушения у крыс, индуцированные социальной изоляцией, продолжавшейся от 4 до 8 недель в разные периоды постнатального онтогенеза, сопровождались усилением экспрессии белков-маркёров апоптоза [49–51]. В экспериментах на культуре клеток симпатических нейронов выявлено, что proBDNF может оказывать проапоптотическое действие в случае образования комплекса рецепторов p75NTR (рецептор нейротрофинов) и NTSR3/сортилина (не сопряженный с G-белками рецептор нейротензина-3) [47]. Возможно, выявленное в настоящем исследовании снижение уровня proBDNF в ФК у самок крыс с развившимся на фоне социальной изоляции нарушением памяти является адаптивным ответом на проапоптотическое действие этого белка.

В нашем исследовании на малой выборке мы обнаружили лишь тенденцию к снижению уровня SYP у самцов-изолянтов только в ФК. В работе Carvalho-Netto et al. [52] показано, что иммунореактивность SYP в префронтальной коре не подвергавшихся стрессу крыс Sprague-Dawley была ниже у самцов по сравнению с самками. Авторы рассматривали этот факт, как свидетельство половых различий в физиологической организации пресинаптической иннервации у крыс, однако 14-дневный хронический непредсказуемый стресс не изменял иммунореактивность белка ни у самцов, ни у самок. В нашем исследовании хронический стресс был принципиально другого характера и значительно большей продолжительности, однако и в этом случае статистически значимых различий в экспрессии SYP выявить не удалось. Надо отметить, что изменения уровня одного из маркёров нейропластичности BDNF (в настоящем исследовании –

его незрелой формы proBDNF) или SYP в одной и той же структуре мозга может происходить без изменения уровня другого [53].

Неожиданным результатом настоящей работы является то, что при длительном 9-месячном стрессе СИ нам не удалось выявить изменений маркёров нейропластичности в ГП, тогда как при действии других видов стресса и менее продолжительной СИ (длительностью 2 и 8 недель) такие изменения были многократно описаны [16, 20, 21, 23, 24]. Однако после острого стресса депривации от матери у крысят подросткового возраста обоего пола и при 8-недельной СИ взрослых самок крыс не было выявлено изменений уровня SYP в ГП [22, 46]. Можно полагать, что одним из ключевых моментов в объяснении отсутствия изменения уровня маркёров нейропластичности в ГП в нашем исследовании является большой срок изоляции, за время которого могла произойти адаптация к нейропластическим изменениям, развившимся в раннем возрасте.

В настоящей работе, насколько нам известно, впервые получены данные о том, что длительная СИ приводит к снижению уровня PREP в СТР у самцов. У самок крыс статистически значимых изменений экспрессии PREP в этой структуре выявить не удалось, хотя у животных обоих полов была снижена реакция на новизну и ухудшалось обучение в тесте УРПИ. Когнитивный дефицит, предположительно, связывают с повышением активности PREP в структурах мозга, а некоторые ингибиторы PREP проявляют антиамнестические свойства [39, 54]. В настоящее время нет ответа на вопрос, сопровождается ли снижение уровня PREP в СТР у самцов крыс, подвергнутых длительному стрессу СИ, изменением экспрессии гена *prep* и активности фермента. О роли снижения уровня PREP можно судить, только сопоставляя эти данные. Однако обращает на себя внимание тот факт, что изменение экспрессии гена *prep* после 10-недельной СИ самцов крыс, начинавшейся в раннем постнатальном периоде, происходило в ФК [33], тогда как после 9-месячной СИ изменение уровня белка PREP у самцов выявлены в другой структуре мозга – в СТР. В процессы обучения вовлечены обе структуры мозга [55]. Каким образом PREP участвует в этих процессах у крыс разного пола, и происходит ли изменение её роли при увеличении длительности социальной изоляции – ещё предстоит выяснить.

Возможна ли взаимосвязь выявленных изменений экспрессии предшественника нейротрофического фактора BDNF и белка PREP в мозге под влиянием стресса длительной социальной

изоляции? На первый взгляд, ответ должен быть, скорее, отрицательным, и выявленные изменения отражают включение независимых механизмов – изменений в нейротрофической системе мозга и активности одной из пролин-специфических пептидаз. Однако полностью исключить такую взаимосвязь нельзя. Выше мы привели свидетельства того, что хроническая СИ усиливает апоптоз в структурах мозга [49–51], и этот процесс в определенных обстоятельствах может быть запущен предшественником BDNF [47]. Нам не удалось найти в научной литературе прямых доказательств связи PREP с процессами апоптоза. В экспериментах с ингибиторами фермента были получены противоречивые данные: в работе Fiedorowicz et al. [56] ингибирование PREP не предотвращало индуцированную нейротоксином гибель гранулярных нейронов зубчатой извилины ГП; в исследованиях других авторов, напротив, ингибиторы PREP эффективно предотвращали возрастную апоптоз культивируемых нейронов корковых клеток головного мозга крысы и гранулярных клеток мозжечка, а также отсроченную гибель нейронов ГП, индуцированную транзиторной ишемией [цит. по 57]. Авторы работ, в которых было показано нейропротективное действие ингибиторов PREP, считают, что это действие может быть опосредовано нейропептидами – субстратами фермента, которые участвуют в реализации антиапоптотических механизмов. В контексте сказанного привлекает внимание нейропептид с промнестическим действием, нейротензин, который экспрессируется в стриатуме [58, 59] и расщепляется PREP [60, 61]. Нейротензин оказывает антиапоптотическое действие в ЦНС через взаимодействие со своими рецепторами, в частности, с NTSR3/сортилином [62]. NTSR3/сортилин способен формировать гетеродимеры (белковые комплексы) с рецепторами нейротрофинов, в том числе с p75NTR, что, как сказано выше, является триггером proBDNF-индуцированной гибели нейронов, а нейротензин способен противодействовать пронеуротрофин-индуцированному апоптозу путём конкуренции за сайт связывания NTSR3/сортилина, действуя как конкурентный ингибитор [47, 63]. Если исходить из того, что пролонгированная СИ сопровождалась развитием процессов апоптоза у крыс (а это ещё нужно показать на данной модели), то можно предположить, что у животных разного пола включились различные защитные механизмы: у самцов – снижение экспрессии PREP в СТР, ведущее к увеличению уровня антиапоптотического субстрата нейротензина, у самок – снижение экспрессии proBDNF в ФК, ведущее к

уменьшению проапоптотических эффектов. Это предположение требует серьёзной экспериментальной проверки.

Наше исследование имеет ограничения, что важно учитывать при интерпретации полученных данных. В первую очередь отметим, что выборка крыс была невелика. Кроме того, помимо экспрессии белков, мы не оценивали экспрессию генов, кодирующих эти белки, и не оценивали, как сказано выше, активность пролинспецифической протеазы PREP. Мы не исследовали динамику нейропластичности и изменений активности фермента в условиях пролонгированного стресса социальной изоляции. Принимая во внимание сказанное, мы рассматриваем настоящую работу как пилотное исследование, продолжение которого позволит получить новые данные о влиянии продолжительного стресса социальной изоляции на состояние нейротрофической системы мозга и роли PREP в индуцированных стрессом нарушениях поведения и когнитивных функций у крыс в зависимости от пола животных.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-315-90110) и государственного задания ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей пато-

логии и патофизиологии (рег. № НИОКТР АА-АА-А19-119100790089-5).

**Благодарности.** Авторы выражают благодарность доктору биологических наук Юлии Игоревне Кировой за консультации и помощь в проведении исследований методом иммуноблоттинга.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Все процедуры и эксперименты на животных проводили в соответствии с «Правилами надлежашей лабораторной практики», утверждёнными приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016, и ГОСТ 33215-2014, 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» под контролем Этического комитета ФГБНУ «НИИОПП» (протокол утверждения проекта исследования № 6 от 23.11.2018, протокол окончательного утверждения проведённого исследования № 3 от 16.06.2020). Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 86, вып. 6, 2021.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Walker, A. J., Kim, Y., Price, J. B., Kale, R. P., McGillivray, J. A., et al. (2014) Stress, inflammation, and cellular vulnerability during early stages of affective disorders: biomarker strategies and opportunities for prevention and intervention, *Front. Psychiatry*, **5**, 34, doi: 10.3389/fpsy.2014.00034.
- Vargas, J., Junco, M., Gomez, C., and Lajud, N. (2016) Early life stress increases metabolic risk, HPA axis reactivity, and depressive-like behavior when combined with post-weaning social isolation in rats, *PLoS One*, **11**, e0162665, doi: 10.1371/journal.pone.0162665.
- Friedler, B., Crapser, J., and McCullough, L. (2015) One is the deadliest number: the detrimental effects of social isolation on cerebrovascular diseases and cognition, *Acta Neuropathol.*, **129**, 493-509, doi: 10.1007/s00401-014-1377-9.
- Duffy, K. A., McLaughlin, K. A., and Green, P. A. (2018) Early life adversity and health-risk behaviors: proposed psychological and neural mechanisms, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1428**, 151-169, doi: 10.1111/nyas.13928.
- Mumtaz, F., Khan, M. I., Zubair, M., and Dehpour, A. R. (2018) Neurobiology and consequences of social isolation stress in animal model – a comprehensive review, *Biomed. Pharmacother.*, **105**, 1205-1222, doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.086.
- Schweinfurth, M. K. (2020) The social life of Norway rats (*Rattus norvegicus*), *Elife*, **9**, e54020, doi: 10.7554/eLife.54020.
- Fone, K. C., and Porkess, M. V. (2008) Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents – relevance to developmental neuropsychiatric disorders, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **32**, 1087-1102, doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.03.003.17.
- Liu, N., Wang, Y., An, A. Y., Banker, C., Qian, Y.-H., and O'Donnell, J. M. (2020) Single housing-induced effects on cognitive impairment and depression-like behavior in male and female mice involve neuroplasticity-related signaling, *Eur. J. Neurosci.*, **52**, 2694-2704, doi: 10.1111/ejn.14565.
- Siuda, D., Wu, Z., Chen, Y., Guo, L., Linke, M., et al. (2014) Social isolation-induced epigenetic changes in mid-brain of adult mice, *J. Physiol. Pharmacol.*, **65**, 247-255.
- Murgatroyd, C., Patchev, A., Wu, Y., Micale, V., Bockmühl, Y., et al. (2009) Dynamic DNA methylation programs persistent adverse effects of early-life stress, *Nat. Neurosci.*, **12**, 1559-1566, doi: 10.1038/nn.2436.
- Gapp, K., von Ziegler, L., Tweedie-Cullen, R. Y., and Mansuy, I. M. (2014) Early life epigenetic programming and transmission of stress-induced traits in mammals, *BioEssays*, **36**, 491-502, doi: 10.1002/bies.201300116.

12. Gulyaeva, N. V. (2017) Molecular mechanisms of neuroplasticity: an expanding universe, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 237-242, doi: 10.1134/S0006297917030014.
13. Korzhevskii, D. E., Petrova, E. S., Kirik, O. V., Beznin, G. V., and Sukhrukova, E. G. (2010) Neural markers used for investigation of differentiation of stem cells, *Geny Kletki*, **5**, 57-63.
14. Kolos, E. A., Grigoriev, I. P., and Korzhevskii, D. E. (2015) Marker of synaptic contacts – synaptophysin, *Morfologiya*, **147**, 79-83.
15. Hao, Y., Shabanpoor, A., and Metz, G. A. (2017) Stress and corticosterone alter synaptic plasticity in a rat model of Parkinson's disease, *Neurosci. Lett.*, **651**, 79-87, doi: 10.1016/j.neulet.2017.04.063.
16. Xu, H., He, J., Richardson, J. S., and Li, X. M. (2004) The response of synaptophysin and microtubule-associated protein 1 to restraint stress in rat hippocampus and its modulation by venlafaxine, *J. Neurochem.*, **91**, 1380-1388, doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02827.x.
17. Gemmel, M., Kokras, N., Dalla, C., and Pawluski, J. L. (2018) Perinatal fluoxetine prevents the effect of pre-gestational maternal stress on 5-HT in the PFC, but maternal stress has enduring effects on mPFC synaptic structure in offspring, *Neuropharmacology*, **128**, 68-180, doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.10.009.
18. Zhang, L., Luo, J., Zhang, M., Yao, W., Ma, X., and Yu, S. Y. (2014) Effects of curcumin on chronic, unpredictable, mild, stress-induced depressive-like behaviour and structural plasticity in the lateral amygdala of rats, *Int. J. Neuropsychopharmacology*, **17**, 793-806, doi: 10.1017/S1461145713001661.
19. Heschem, S., Grace, L., Kellaway, L. A., Bugarith, K., and Russell, V. A. (2009) Effect of exercise on synaptophysin and calcium/calmodulin-dependent protein kinase levels in prefrontal cortex and hippocampus of a rat model of developmental stress, *Metab. Brain Dis.*, **24**, 701-709, doi: 10.1007/s11011-009-9165-2.
20. Andersen, S. L., and Teicher, M. H. (2004) Delayed effects of early stress on hippocampal development, *Neuropsychopharmacology*, **29**, 1988-1993, doi: 10.1038/sj.npp.1300528.
21. Dandi, E., Kalamari, A., Touloumi, O., Lagoudaki, R., Nousiopolou, E., et al. (2018) Beneficial effects of environmental enrichment on behavior, stress reactivity and synaptophysin/BDNF expression in hippocampus following early life stress, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **67**, 19-32, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2018.03.003
22. Ramos-Ortolaza, D. L., Doreste-Mendez, R. J., Alvarado-Torres, J. K., and Torres-Reveron, A. (2017) Ovarian hormones modify anxiety behavior and glucocorticoid receptors after chronic social isolation stress, *Behav. Brain Res.*, **328**, 115-122, doi: 10.1016/j.bbr.2017.04.016.
23. Varty, G. B., Marsden, C. A., and Higgins, G. A. (1999) Reduced synaptophysin immunoreactivity in the dentate gyrus of prepulse inhibition-impaired isolation-reared rats, *Brain Res.*, **824**, 197-203, doi: 10.1016/S0006-8993(99)01173-7.
24. Das, S. K., Baitharu, I., Barhwal, K., Hota, S. K., and Singh, S. B. (2016) Early mood behavioral changes following exposure to monotonous environment during isolation stress is associated with altered hippocampal synaptic plasticity in male rats, *Neurosci. Lett.*, **612**, 231-237, doi: 10.1016/j.neulet.2015.12.038.
25. Bondar, N. P., and Merkulova, T. I. (2016) Brain-derived neurotrophic factor and early-life stress: Multifaceted interplay, *J. Biosci.*, **41**, 751-758, doi: 10.1007/s12038-016-9648-3.
26. Paltsyn, A. A. (2019) Neurotrophic brain factor – BDNF, *Patogenez*, **17**, 83-88, doi: 10.25557/2310-0435.2019.03.83-88.
27. Hempstead, B. L. (2015) Brain-derived neurotrophic factor: three ligands, many actions, *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.*, **126**, 9-19.
28. Giacobbo, L. B., Doorduyn, J., Klein, H. C., Dierckx, R. A. J. O., Bromberg, E., and de Vries, E. F. J. (2019) Brain-derived neurotrophic factor in brain disorders: focus on neuroinflammation, *Mol. Neurobiol.*, **56**, 3295-3312, doi: 10.1007/s12035-018-1283-6.
29. Wang, M., Xie, Y., and Qin, D. (2021) Proteolytic cleavage of proBDNF to mBDNF in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases, *Brain Res. Bull.*, **166**, 172-184, doi: 10.1016/j.brainresbull.2020.11.005.
30. Hill, R. A., Klug, M., Kiss Von Soly, S., Binder, M. D., Hannan, A. J., and van den Buuse, M. (2014) Sex-specific disruptions in spatial memory and anhedonia in a "two hit" rat model correspond with alterations in hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and signaling. *Hippocampus*, **24**, 1197-1211, doi: 10.1002/hipo.22302.
31. Yeh, C. M., Huang, C. C., and Hsu, K. S. (2012) Prenatal stress alters hippocampal synaptic plasticity in young rat offspring through preventing the proteolytic conversion of pro-brain-derived neurotrophic factor (BDNF) to mature BDNF, *J. Physiol.*, **590**, 991-1010, doi: 10.1113/jphysiol.2011.222042.
32. Li, M., Du, W., Shao, F., and Wang, W. (2016) Cognitive dysfunction and epigenetic alterations of the BDNF gene are induced by social isolation during early adolescence, *Behav. Brain Res.*, **313**, 177-183, doi: 10.1016/j.bbr.2016.07.025.
33. Zubkov, E. A., Zorkina, Ya. A., Orshanskaya, E. V., Khlebnikova, N. N., Krupina, N. A., and Chekhnin, V. P. (2019) Post-weaning social isolation disturbs gene expression in rat brain structures, *Bull. Exper. Biol. Med.*, **166**, 364-368, doi: 10.1007/s10517-019-04351-0.
34. Garcia-Horsman, J. A. (2020) The role of prolyl oligopeptidase, understanding the puzzle, *Ann. Transl. Med.*, **8**, 983, doi: 10.21037/atm-20-3412.
35. Männistö, P. T., and Garcia-Horsman, J. A. (2017) Mechanism of action of prolyl oligopeptidase (PREP) in degenerative brain diseases: has peptidase activity only a modulatory role on the interactions of PREP with proteins? *Front. Aging Neurosci.*, **9**, 27, doi: 10.3389/fnagi.2017.00027.
36. Kushnareva, E. Yu., Krupina, N. A., Khlebnikova, N. N., Zolotov, N. N., and Kryzhanovskii, G. N. (2011) Activities of proline-specific peptidases in brain structures of rats with experimental anxiety-depressive state caused by administration dipeptidyl peptidase IV inhibitor in the early postnatal period, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **151**, 675-679, doi: 10.1007/s10517-011-1413-x.
37. Khlebnikova, N. N., Krupina, N. A., Kushnareva, E. Yu., and Orlova, I. N. (2015) Differences in active avoidance conditioning in male and female rats with experimental anxiety-depressive disorder, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **159**, 337-340, doi: 10.1007/s10517-015-2956-z.
38. Zubkov, E. A., Zorkina, Ya. A., Orshanskaya, E. V., Khlebnikova, N. N., Krupina, N. A., and Chekhonin, V. P.

- (2017) Changes in gene expression profiles in adult rat brain after neonatal action of dipeptidyl peptidase-IV inhibitors, *Neuropsychobiology*, **76**, 89-99, doi: 10.1159/000488367.
39. Nazarova, G. A., Zolotov, N. N., Krupina, N. A., Kraineva, V. A., Garibova, T. L., and Voronina, T. A. (2007) Changes in proline-specific peptidase activity in experimental model of retrograde amnesia, *Eksp. klinich. farmakol.*, **70**, 6-8, doi: 10.30906/0869-2092-2007-70-6-6-8.
40. Krupina, N. A., Shirenova, S. D., and Khlebnikova, N. N. (2020) Prolonged social isolation, started early in life, impairs cognitive abilities in rats depending on sex, *Brain Sci.*, **10**, 799, doi: 10.3390/brainsci10110799.
41. Hall, F. S., Humby, T., Wilkinson, L., and Robbins, T. (1997) The effects of isolation-rearing of rats on behavioural responses to food and environmental novelty, *Physiol. Behav.*, **62**, 281-290, doi: 10.1016/S0031-9384(97)00115-7.
42. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
43. Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing, *J. R. Stat. Soc. Ser. B*, **57**, 289-300, doi: 10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x.
44. Psychometrica: Computation of effect sizes. 11. Effect size calculator for non-parametric tests: Mann-Whitney-U, Wilcoxon-W and Kruskal-Wallis-H, URL: [https://www.psychometrica.de/effect\\_size.html](https://www.psychometrica.de/effect_size.html).
45. Cohen, J. (1988) *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, Edn. 2, Hillsdale, Erlbaum.
46. Marco, E. M., Valero, M., de la Serna, O., Aisa, B., Borcel, E., et al. (2013) Maternal deprivation effects on brain plasticity and recognition memory in adolescent male and female rats, *Neuropharmacology*, **68**, 223-231, doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.08.014.
47. Teng, H. K., Teng, K. K., Lee, R., Wright, S., Tevar, S., et al. (2005) ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin, *J. Neurosci.*, **25**, 5455-5463, doi: 10.1523/JNEUROSCI.5123-04.2005.
48. Gibon, J., Buckley, S. M., Unsain, N., Kaartinen, V., Seguela, P., and Barker, P. A. (2015) proBDNF and p75NTR control excitability and persistent firing of cortical pyramidal neurons, *J. Neurosci.*, **35**, 9741-9753, doi: 10.1523/jneurosci.4655-14.2015.
49. Park, S.-S., Park, H. S., Kim, T. W., and Lee, S. J. (2020) Effects of swimming exercise on social isolation-induced memory impairment and apoptosis in old rats, *J. Exerc. Rehabil.*, **16**, 234-241, doi: 10.12965/jer.2040366.183.
50. Park, H.-S., Kim, T.-W., Park, S.-S., Lee, S.-J. (2020) Swimming exercise ameliorates mood disorder and memory impairment by enhancing neurogenesis, serotonin expression, and inhibiting apoptosis in social isolation rats during adolescence, *J. Exerc. Rehabil.*, **16**, 132-140, doi: 10.12965/jer.2040216.108.
51. Kim, T.-W., Park, S.-S., Shin, M.-S., Park, H.-S., and Baek, S.-S. (2020) Treadmill exercise ameliorates social isolation-induced memory impairment by enhancing silent information regulator-1 expression in rats, *J. Exerc. Rehabil.*, **16**, 227-233, doi: 10.12965/jer.2040400.200.
52. Carvalho-Netto, E. F., Myers, B., Jones, K., Solomon, M. B., and Herman, J. P. (2011) Sex differences in synaptic plasticity in stress-responsive brain regions following chronic variable stress, *Physiol. Behav.*, **104**, 242-247, doi: 10.1016/j.physbeh.2011.01.024.
53. Yau, S. Y., Li, A., Zhang, E. D., Christie, B. R., Xu, A., et al. (2014) Sustained running in rats administered corticosterone prevents the development of depressive behaviors and enhances hippocampal neurogenesis and synaptic plasticity without increasing neurotrophic factor levels, *Cell Transplant.*, **23**, 481-492, doi: 10.3727/096368914X678490.
54. Babkova, K., Korabecny, J., Soukup, O., Nepovimova, E., Jun, D., and Kuca, K. (2017) Prolyl oligopeptidase and its role in the organism: attention to the most promising and clinically relevant inhibitors, *Future Med. Chem.*, **9**, 1015-1038, doi: 10.4155/fmc-2017-0030.
55. Yavas, E., Gonzalez, S., and Fanselow, M. S. (2019) Interactions between the hippocampus, prefrontal cortex, and amygdala support complex learning and memory, *F1000Res.*, **31**, 8, doi: 10.12688/f1000research.19317.1.
56. Fiedorowicz, A., Figiel, I., Kamińska, B., Zaremba, M., Wilk, S., and Oderfeld-Nowak, B. (2001) Dentate granule neuron apoptosis and glia activation in murine hippocampus induced by trimethyltin exposure, *Brain Res.*, **912**, 116-127, doi: 10.1016/s0006-8993(01)02675-0.
57. Bär, J. W., Rahfeld, J.-U., Schulz, I., Gans, K., Ruiz-Carrillo, D., et al. (2006) Prolyl endopeptidase cleaves the apoptosis rescue peptide humanin and exhibits an unknown post-cysteine cleavage specificity, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **575**, 103-108, doi: 10.1007/0-387-32824-6\_11.
58. Zahm, D. S. (1987) Neurotensin-immunoreactive neurons in the ventral striatum of the adult rat: ventromedial caudate-putamen, nucleus accumbens and olfactory tubercle, *Neurosci. Lett.*, **81**, 41-47, doi: 10.1016/0304-3940(87)90337-5.
59. Liu, Q., Hazan, A., Grinman, E., and Angulo, J. A. (2017) Pharmacological activation of the neurotensin receptor 1 abrogates the methamphetamine-induced striatal apoptosis in the mouse brain, *Brain Res.*, **1659**, 148-155, doi: 10.1016/j.brainres.2017.01.029.
60. Jalkanen, A. J., Puttonen, K. A., Venäläinen, J. I., Sinervä, V., Mannila, A., et al. (2006) Beneficial effect of prolyl oligopeptidase inhibition on spatial memory in young but not in old scopolamine-treated rats, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **100**, 132-138, doi: 10.1111/j.1742-7843.2006.00021.x.
61. Peltonen, I., Myöhänen, T. T., and Männistö, P. T. (2012) Different interactions of prolyl oligopeptidase and neurotensin in dopaminergic function of the rat nigrostriatal and mesolimbic pathways, *Neurochem. Res.*, **37**, 2033-2041, doi: 10.1007/s11064-012-0825-y.
62. Devader, C., Béraud-Dufour, S., Coppola, T., and Mazella, J. (2013) The anti-apoptotic role of neurotensin, *Cells*, **2**, 124-135, doi: 10.3390/cells2010124.
63. Nykjaer, A., and Willnow, T. E. (2012) Sortilin: a receptor to regulate neuronal viability and function, *Trends Neurosci.*, **35**, 261270, doi: 10.1016/j.tins.2012.01.003.

## LONG-TERM SOCIAL ISOLATION REDUCES BDNF PRECURSOR AND PROLYL ENDOPEPTIDASE EXPRESSION IN RAT BRAIN STRUCTURES

S. D. Shirenova\*, N. N. Khlebnikova, and N. A. Krupina

*Institute of General Pathology and Pathophysiology, 125315 Moscow, Russia; E-mail: Shirenova.jr@gmail.com*

Early-life stress is a risk factor for the development of behavioral and cognitive disorders in humans and animals. Such stressful situations include social isolation in early postnatal ontogenesis. Behavioral and cognitive impairments associated with neuroplastic changes in brain structures. We have found that after ten weeks of social isolation, male Wistar rats show behavioral abnormalities and cognitive deficit, accompanied by an increase in the relative expression of gene encoding serine protease prolyl endopeptidase (PREP, EC 3.4.21.26) in the brain frontal cortex. The present study aimed to assess synaptophysin (SYP), brain-derived neurotrophic factor precursor (proBDNF), and PREP expression using Western blot in the brain structures – the hippocampus, frontal cortex, and striatum of the rats subjected to prolonged social isolation compared with group-housed animals. Twenty Wistar rats were used for this study (10 males and 10 females). Experimental animals (5 males and 5 females) were kept one per cage for nine months, starting from the age of one month. Ten-month-old socially isolated rats showed memory deficit in passive avoidance paradigm and Morris Water Maze and reactivity to novelty reduction. We used monoclonal antibodies for the Western blot analysis of the expression of SYP, proBDNF, and PREP in the rat brain structures. Social isolation caused a proBDNF expression reduction in the frontal cortex in females and a reduction in PREP expression in the striatum in males. These data suppose that neurotrophic factors and PREP are involved in the mechanisms of behavioral and cognitive impairments observed in the rats subjected to prolonged social isolation with an early life onset.

**Keywords:** social isolation, neuroplasticity, synaptophysin, BDNF precursor, prolyl endopeptidase, brain structures, Western blot

## ПРЕНАТАЛЬНЫЙ СТРЕСС ПРИ МАТЕРИНСКОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ: НАРУШЕНИЯ РАЗВИТИЯ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ ПЛОДА И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ПЛАЦЕНТЫ

### Обзор

© 2021 А.В. Арутюнян<sup>1,2\*</sup>, Г.О. Керкешко<sup>2</sup>, Ю.П. Милютин<sup>1</sup>,  
А.Д. Щербицкая<sup>1,3</sup>, И.В. Залозня<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Д.О. Отта»,  
199034 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: alexarutunjan@gmail.com

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии, 197110 Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии  
и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223 Санкт-Петербург, Россия

Поступила в редакцию 18.12.2020

После доработки 19.02.2021

Принята к публикации 19.02.2021

Обзор посвящён современным представлениям о гипергомоцистеинемии (ГГЦ) матери, как важном факторе, вызывающем пренатальный стресс и нарушения развития нервной системы плода и новорождённого в раннем онтогенезе, имеющие отдалённые последствия во взрослом возрасте. Приводятся экспериментальные доказательства влияния пренатальной ГГЦ (ПГГЦ) на морфологическое созревание мозга и активность его нейромедиаторных систем. Отмеченный в экспериментальных исследованиях когнитивный дефицит у потомства после воздействия ПГГЦ может рассматриваться как одна из причин предрасположенности к различным нейродегенеративным заболеваниям, роль ГГЦ матери в патогенезе которых доказана в клинике. Рассмотрены молекулярные механизмы нейротоксического воздействия ПГГЦ на развитие нервной системы в пренатальный и ранний постнатальный период, к которым относятся окислительный стресс и активация апоптоза, влияние на степень метилирования ДНК и уровни микроРНК, воздействие на экспрессию и процессинг нейротрофинов, а также нейровоспаление, вызванное повышенной выработкой провоспалительных цитокинов. Особое место в представленном обзоре уделено проблеме влияния материнской ГГЦ на функциональное состояние плаценты и его возможному вкладу в нарушение мозговых функций у потомства. Анализ литературных данных позволяет предположить, что ряд механизмов воздействия ПГГЦ на развивающийся мозг плода может быть обусловлен нарушением транспортных функций плаценты, приводящим к недостаточному поступлению питательных веществ, необходимых для правильного формирования структуры и функций мозга.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ранний онтогенез, плод, новорождённый, мозг, материнская гипергомоцистеинемия, пренатальная гипергомоцистеинемия, плацента, ангиогенез, нейрогенез.

DOI: 10.31857/S0320972521060099

### ВВЕДЕНИЕ. ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЯ МАТЕРИ КАК РАЗНОВИДНОСТЬ ПРЕНАТАЛЬНОГО СТРЕССА

Материнский стресс во время беременности может вызывать у развивающегося плода серию

повреждений, которые имеют долгосрочные последствия для здоровья ребёнка [1]. Стимулы, действующие в критические периоды развития плода, способны запускать ряд дезадаптивных механизмов и изменять экспрессию генов, что оказывает значительное влияние на строение и

Принятые сокращения: ГЦ – гомоцистеин; ГГЦ – гипергомоцистеинемия; МТГФР – метилентетрагидрофолатредуктаза; ПГГЦ – пренатальная гипергомоцистеинемия; BDNF – нейротрофический фактор мозга (Brain-Derived Neurotrophic Factor); CBS – цистатионин-β-синтаза (cystathionine β-synthase); CSE – цистатионин-γ-лиаза (cystathionine γ-lyase); E – день пренатального развития; F1 – потомство первого поколения; NGF – фактор роста нервов (Nerve Growth Factor); P – день постнатального развития; SAH – S-аденозилгомоцистеин (S-adenosylhomocysteine); SAM – S-аденозилметионин (S-adenosylmethionine).

\* Адресат для корреспонденции.

функции тканей и органов, причём последствия этого негативного влияния могут передаваться из поколения в поколение [2].

Онтогенез мозга значительно длиннее, чем у других органов, он простирается от эмбрионального периода жизни до неонатального, младенческого, детского и подросткового возраста. Согласно одному из принципов программирования развития организма, мозг, как орган, претерпевающий изменения на протяжении длительного времени, особенно уязвим к неблагоприятным воздействиям условий окружающей среды. Пренатальный период развития мозга исключительно важен, так как в это время формируются основные мозговые структуры [3], под влиянием эндокринных и иммунных механизмов происходит миграция и дифференцировка нейронов и клеток глии, созревание синапсов и многие другие процессы нейрогенеза [4].

Воздействие стресса в пренатальный период может оказать пагубное воздействие на развивающийся мозг плода вследствие гиперактивации материнской гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. Повышенная продукция кортизола у матери способствует увеличению выработки плацентарного кортикотропин-рилизинг-фактора с последующей стимуляцией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси плода и увеличением уровня кортизола в его крови [2]. Избыточное воздействие на плод глюкокортикоидов может приводить к задержке роста плода и к необратимым изменениям структуры и функций его органов, предрасполагая к развитию заболеваний в последующей жизни [5]. Одним из следствий такого воздействия может являться структурная дегенерация и нарушение функционирования гиппокампа и префронтальной коры головного мозга, что приводит к повышенному риску развития в более позднем возрасте психоневрологических расстройств, включая депрессию и деменцию [2, 4, 6]. Плацента является барьером, ограничивающим воздействие глюкокортикоидов матери на плод, благодаря обильной экспрессии инактивирующего глюкокортикоиды фермента  $11\beta$ -гидроксистероиддегидрогеназы 2-го типа. Подавление активности или генетический дефицит этого фермента в плаценте связан со значительным снижением роста плода и массы тела при рождении, а также с запрограммированными поведенческими отклонениями во взрослом возрасте [5].

К факторам, вызывающим пренатальный стресс и влияющим на здоровье потомства, помимо эмоциональных факторов, относят также и метаболические стрессоры: недостаточное питание матери и воздействие на организм матери и плода токсических веществ [7]. Гипергомоцис-

теинемия (ГЦ) матери, т.е. повышенное содержание в крови беременной женщины непротеиногенной аминокислоты гомоцистеина (ГЦ), свободно проходящей через фетоплацентарный барьер и обладающей выраженными нейротоксическими свойствами [8, 9], может рассматриваться как разновидность метаболического пренатального стресса, оказывающего долгосрочное неблагоприятное влияние на развивающийся плод и прежде всего на его нервную систему.

Не исключено и взаимовлияние ГЦ и эмоционального стресса, хотя этот вопрос остаётся недостаточно изученным. У здоровых людей отмечена положительная корреляция между уровнями кортизола и ГЦ в крови [10], повышение уровня ГЦ наблюдалось у женщин после психологического стресса [11], а также у женщин, страдающих депрессией [12]. В экспериментах на животных показано, что психологический стресс вызывает повышение уровня ГЦ, связанное с ингибирующим воздействием глюкокортикоидов на катаболизм ГЦ в печени [13].

Поскольку механизмы возникновения ГЦ, а также некоторые аспекты токсического действия ГЦ обусловлены особенностями его обмена, следует рассмотреть метаболизм этого соединения.

### МЕТАБОЛИЗМ ГОМОЦИСТЕИНА В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

ГЦ образуется как продукт деметилирования метионина, поступающего в организм в составе белков пищи [14]. Обмен ГЦ неразрывно связан с метиониновым и фолатным циклами (рисунк). В ходе метионинового цикла под действием метионаденозилтрансферазы метионин превращается в S-аденозилметионин (SAM), который служит донором метильных групп для метилирования ДНК, РНК, гистонов, фосфолипидов, катехоламинов и других субстратов. В результате реакций метилирования, катализируемых метилтрансферазами, SAM превращается в S-аденозилгомоцистеин (SAH), гидролизующийся затем до ГЦ под действием S-аденозилгомоцистеингидролазы. Поскольку SAH является ингибитором метилтрансфераз по механизму ингибирования продуктом реакции, внутриклеточное соотношение SAM/SAH рассматривается как показатель потенциальной способности клетки к метилированию [15]. Реакция гидролиза SAH обратима, её равновесие смещено в обратном направлении, поэтому для протекания реакции в сторону образования ГЦ необходимо постоянное его удаление. В клетках большинства органов и тканей низкое содержание ГЦ



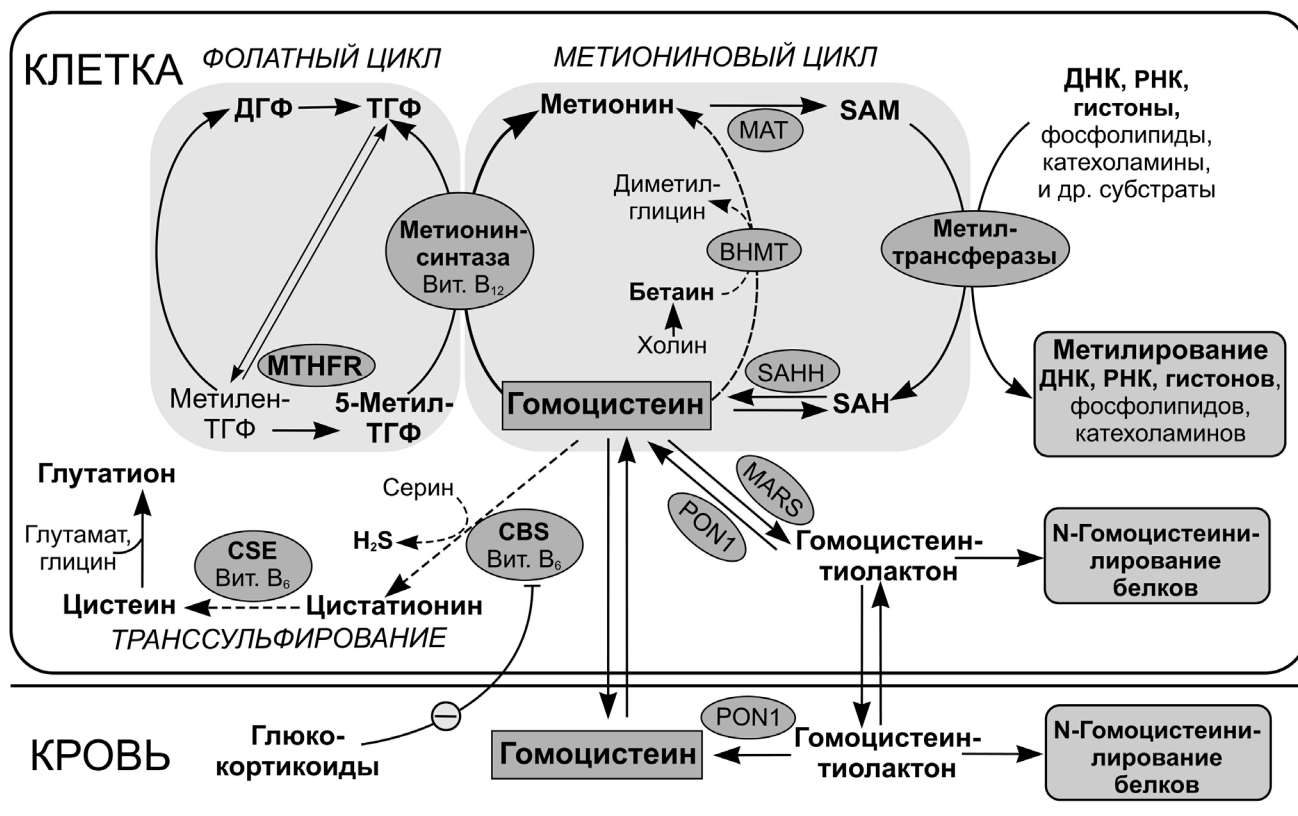


Схема метаболизма гомоцистеина. ДГФ – дигидрофолат; ТГФ – тетрагидрофолат; BHMT – бетаингомоцистеинметилтрансфераза; CBS – цистатионин-β-синтаза; CSE – цистатионин-γ-лиаза; MARS – метионил-tPHK-синтаза; MAT – метионинаденозилтрансфераза; MTHFR – метилтетрагидрофолатредуктаза; PON1 – параоксоназа 1; SAH – S-аденозилгомоцистеин; SAHN – S-аденозилгомоцистеингидролаза; SAM – S-аденозилметионин. Пунктирными линиями обозначены пути метаболизма, присутствующие не во всех тканях

обеспечивается либо путём его вовлечения в метиониновый цикл через фолат-зависимое реметилирование до метионина, либо посредством транспорта за пределы клетки [16]. Отмечено, что уровень общего ГЦ в крови коррелирует с содержанием внутриклеточного SAH [17].

Удаление избытка ГЦ в крови осуществляется также через катаболический путь его транссульфирования до цистеина ферментами цистатионин-β-синтазой (CBS) и цистатионин-γ-лиазой (CSE), использующими в качестве кофактора пиридоксальфосфат (витамин B<sub>6</sub>) (рисунок) [18]. Генетические нарушения активности ферментов транссульфирования приводят к особенно выраженной ГГЦ. Ферменты CBS и CSE обнаружены в различных тканях, но наибольшее значение в инактивации ГЦ путём транссульфирования отводится печени и почкам [16]. Снижение экспрессии гена CBS и активности фермента CBS в печени под влиянием глюкокортикоидов сопровождается повышением уровня ГЦ в крови [13]. Ранее считалось, что путь транссульфирования в мозге является неза-

вершённым из-за отсутствия экспрессии CSE [19]. Однако к настоящему времени собрано достаточно количество данных, свидетельствующих о наличии в мозге полностью функционального пути транссульфирования [20], характеризующегося значительным уровнем экспрессии генов CBS и CSE, уровня белков и активности этих ферментов [21–23]. Предполагается, что путь транссульфирования играет важную роль в обеспечении антиоксидантной защиты мозга за счёт образования глутатиона [20, 24], а также сероводорода – газотрансмиттера, обладающего антиоксидантными и нейропротекторными свойствами [18, 22, 23].

Цикл метионина связан с циклом фолиевой кислоты, активная форма которой, 5-метилтетрагидрофолат, является источником метильных групп для реметилирования ГЦ с образованием метионина (рисунок). Катализирует данную реакцию фермент метионинсинтаза, в качестве кофермента использующий витамин B<sub>12</sub>. Главным образом в печени и почках функционирует также фолат-независимый путь ремети-

лирования ГЦ с использованием фермента бетаингомоцистеинметилтрансферазы и бетаина в качестве донора метильной группы. Поскольку в мозге фолат-независимый путь превращения ГЦ в метионин отсутствует, фолаты являются особенно необходимыми для предотвращения негативных эффектов высоких концентраций ГЦ на нервную систему. Повышение уровня ГЦ в крови наблюдается при недостатке фолатов в пище, а также при генетически обусловленных нарушениях активности ферментов их биосинтеза, в первую очередь метилентетрагидрофолатредуктазы (МТГФР) (рисунок).

Один из путей метаболизма ГЦ, во многом обуславливающий его нейротоксичность, связан с образованием обладающего высокой реакционной способностью его метаболита ГЦ-тиолактона, синтез которого катализируется ферментом метионил-тРНК-синтетазой (рисунок). ГЦ-тиолактон обладает значительно более выраженным токсическим эффектом по сравнению с самим ГЦ [25, 26]. Основным ферментом, гидролизующим ГЦ-тиолактон с образованием ГЦ, является параоксоназа 1, присутствующая главным образом в крови в составе липопротеинов высокой плотности, но также экспрессируемая и в мозге [27]. ГЦ-тиолактон способен образовывать ковалентную связь со свободной  $\epsilon$ -аминогруппой лизина в составе различных белков. Этот процесс, называемый N-гомоцистеинилированием белков, может вызывать значительные повреждения их структуры и функций, являясь одной из причин развития нейродегенеративных заболеваний [19, 28].

### **ВЗАИМОСВЯЗЬ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ С НЕВРОЛОГИЧЕСКИМИ РАССТРОЙСТВАМИ**

Многочисленные клинко-эпидемиологические данные подтверждают наличие взаимосвязи между уровнем ГЦ в крови и риском развития различных нервно-психических заболеваний (сосудистые деменции, болезнь Альцгеймера, шизофрения, аутизм и др.) [29–32], однако до сих пор нет однозначного ответа на вопрос: является повышенное содержание ГЦ причиной или следствием их развития [16, 33]. В экспериментальных работах показано, что избыток ГЦ в организме животных моделирует признаки и симптомы нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Альцгеймера и сосудистой деменции [31, 34].

Данные о воздействии ГЦ на развитие неврологических нарушений у детей пока немногочисленны [32]. В экспериментальной модели отмечено, что материнская ГЦ вызывала у потомства крыс спектр поведенческих реакций, сходных с наблюдающимися при аутизме [35]. Согласно клиническим исследованиям, у детей, страдающих расстройствами аутистического спектра, наблюдается повышенный уровень ГЦ и сниженное содержание фолиевой кислоты, витаминов В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> [32]. Прием фолиевой кислоты приводил к снижению уровня ГЦ в крови и улучшению клинической картины у таких детей, что позволяет считать ГЦ полезным биомаркером для диагностики и оценки эффективности лечения расстройств аутистического спектра [36]. Наличие у матерей генетического полиморфизма, снижающего транспорт в клетки активной формы фолатов и характеризующегося повышенным уровнем ГЦ, SAH и гипометилированием ДНК в крови, значительно повышало риск возникновения у детей аутистических расстройств. Присутствие подобного врожденного полиморфизма у самих детей не влияло на риск развития у них аутизма, что позволяет предположить наличие влияния измененного метаболизма матерей в пренатальный период на развитие аутистических отклонений у их детей [37].

### **ПРЕНАТАЛЬНАЯ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЯ КАК ФАКТОР НАРУШЕНИЙ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ У ПОТОМСТВА**

Повышение уровня ГЦ в организме плода в пренатальный период, обусловленное повышенным содержанием этого соединения в крови матери, так называемая пренатальная ГЦ (ПГЦ), относится к патологическим факторам, способным нарушать процессы развития мозга плода и вызывать стойкие отдаленные последствия в различных функциональных системах растущего организма в постнатальном периоде [38–41]. Известно, что небольшие или даже едва заметные изменения в структуре или функциях мозга плода могут постепенно и существенно возражать с течением времени, вызывая длительный или постоянный когнитивный дефицит [38, 41, 42].

Результаты клинических исследований указывают на то, что высокий уровень общего ГЦ и/или недостаточность фолиевой кислоты и витамина В<sub>12</sub> на ранних сроках беременности оказывают долгосрочное влияние на развитие мозга плода [38, 41, 42]. Несмотря на неоднородность и незавершенность обсервационных исследований по данной теме, примерно в поло-

вине из них отмечается положительная взаимосвязь между материнским уровнем фолиевой кислоты и когнитивными способностями у потомства. Недавно было показано, что у детей, матери которых во время беременности имели пониженный уровень фолатов и повышенное содержание ГЦ в крови, в возрасте 6 лет уровень IQ был снижен на 7 пунктов. При этом наблюдалась обратная зависимость между уровнем ГЦ матерей во время беременности и успешностью выполнения заданий на языковые способности и зрительно-пространственную ориентацию у их детей [43].

В экспериментальных моделях ПГГЦ когнитивные нарушения были отмечены у потомства крыс и мышей, самки которых имели повышенный уровень ГЦ и/или пониженный уровень фолатов в крови во время беременности вследствие введения им метионина, диеты с дефицитом метильных доноров или генетического нарушения биосинтеза фолатов [38, 40–42, 44–53]. В первый месяц жизни, начиная с 5-го дня постнатального развития (P5), у потомства таких животных отмечалась задержка формирования сенсомоторных рефлексов, снижение локомоторной активности, нарушение пространственного обучения и координации движений, а также значительные расстройства краткосрочной и долговременной памяти [40, 44–48]. В возрасте 1–3 месяцев у животных, перенёсших ПГГЦ, наряду с повышенным уровнем общей двигательной активности и тревожности, наблюдались снижение мышечной силы и координации движений, нарушения мелкой моторики, а также ухудшение пространственной памяти и обучения [38, 40–42, 49–53].

Следует отметить, что в большинстве упомянутых выше экспериментальных исследований воздействие материнской ГГЦ на потомство включало как период беременности, так и ранний послеродовой период вплоть до окончания лактации. В этой связи представляет интерес исследование, в котором вызванная недостатком фолатов материнская ГГЦ, продолжавшаяся с момента родов вплоть до окончания лактации, приводила у взрослого потомства к нарушениям поведенческих реакций, сходным с наблюдавшимися у животных, переносивших ГГЦ, начиная с внутриутробного периода развития [54].

В большинстве исследований поведенческие тесты у потомства матерей с ГГЦ проводились на самцах, так как их поведенческие реакции легче поддаются анализу вследствие отсутствия характерных для самок циклических изменений гормонального фона. В отдельных работах показано, что у половозрелых самок крыс потомства

первого поколения (F1), перенёсших ПГГЦ, также наблюдается нарушение краткосрочной и долговременной памяти [42]. Более того, недавно установлено, что ПГГЦ оказывает наиболее выраженное влияние на потомство женского пола F1, вызывая более стойкие по сравнению с самцами морфологические и биохимические изменения в гиппокампе, сопровождающиеся снижением когнитивных способностей вплоть до 11-го месяца постнатальной жизни [55].

### МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ НА МОЗГ

Одним из основных механизмов нейротоксичности ГЦ является индуцируемый им окислительный стресс [8], роль которого в негативных эффектах ПГГЦ усиливается ввиду того, что формирующаяся в раннем онтогенезе нервная система обладает повышенной чувствительностью к свободнорадикальному окислению и низкой активностью антиоксидантной защиты [56, 57]. ПГГЦ вызывала повышение перекисного окисления липидов, окислительной модификации белков и ДНК, снижение активности супероксиддисмутазы и общей антиоксидантной активности в мозге плодов крыс на 20-й день пренатального развития (E20) и в мозге новорождённых крысят (P1) [39, 56, 58]. Повышение уровня продуктов перекисного окисления липидов, сопровождавшееся снижением активности ферментов антиоксидантной защиты, повышением генерации активных форм кислорода и снижением жизнеспособности нейронов наблюдалось в мозге таких животных и в ходе дальнейшего постнатального развития (P12–P13, P21, P28) [53, 59]. Характерно, что высокий уровень перекисного окисления липидов и сниженная активность глутатионпероксидазы сохранялись у взрослых животных F1, перенёсших ГГЦ в пренатальном и раннем постнатальном возрасте [52]. Роль окислительного стресса в индуцированных ПГГЦ нарушениях развития нервной системы и когнитивных функций потомства подтверждается также тем, что они могут быть устранены путём введения животным во время беременности мелатонина, коротких пептидов эпиталона и карнозина, а также сероводорода, обладающих антиоксидантными и антиапоптотическими свойствами [41, 44, 50, 52, 60, 61].

В нервной системе ГГЦ вызывает развитие окислительного стресса за счёт активации глутаматных NMDA-рецепторов, а также метаболитного глутаматного рецептора mGluR5, что

приводит к апоптозу нейронов и глиальных клеток [8, 62]. В цельном мозге плодов (E20), а также в отдельных его структурах (гиппокамп, кора) у новорождённых крысят, перенёсших ПГГЦ, отмечались признаки апоптоза (фрагментация ДНК, активация каспазы 3, повышение проапоптотического маркера p53, снижение антиапоптотического маркера Bcl-2) [39, 63, 64]. В гиппокампе таких животных усиление процессов апоптоза (повышение содержания и активности каспазы 3, увеличение количества апоптотических клеток) наблюдалось вплоть до прекращения грудного вскармливания (P20–P21), причём активация апоптоза отмечалась в основном в тех клетках, где накапливался ГЦ [40, 46, 65, 66].

Повышение в крови матери уровня провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-1 $\beta$ , способных проникать через фетоплацентарный барьер и влиять на программирование развития мозга плода, относят к числу причин долгосрочных нарушений развития мозга у потомства [3, 67, 68]. В экспериментальных работах показан провоспалительный эффект хронической ГЦ, выражающийся в повышении содержания провоспалительных цитокинов (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) в крови и мозге взрослых крыс [69]. В модели ПГГЦ также было обнаружено повышение уровня IL-1 $\beta$  в крови и плаценте беременных самок крыс на 20 день беременности [64]. В теменной коре мозга крысят (P5 и P20), перенёсших ПГГЦ, наблюдалось увеличение количества астроглиальных и микроглиальных клеток, сопровождающееся повышением содержания IL-1 $\beta$  и фосфорилирования p38 MAPK, что позволяет предположить развитие нейровоспалительных процессов [66].

В период эмбрионального развития каждая клетка, ткань и орган приобретают характерные только для них паттерны экспрессии генов, которые, как считается, опосредуются эпигенетическими модификациями, в частности метилированием ДНК [70]. Количество и состав питательных веществ, которые поступают к плоду от матери, может оказывать воздействие на этот важный эпигенетический процесс, влияя тем самым на развитие плода и даже на состояние здоровья потомства в его дальнейшей жизни [15]. Предполагается, что нарушения развития нервной системы плода, в том числе врождённые дефекты развития нервной трубки, фактором риска развития которых является снижение уровня фолатов и повышение содержания ГЦ в крови матери, могут быть связаны с эпигенетическими регуляторными механизмами, контролирующими пролиферацию и дифференцировку нейронов [70, 71]. В мозге плодов с дефектами нервной трубки наблюдалось сниже-

ние общего метилирования ДНК, а также снижение метилирования мобильных элементов генома *L1NE-1* и повышение содержания их транскриптов, вызывающих хромосомную нестабильность, с которой, как предполагают, связано возникновение дефектов нервной трубки. Снижение уровня метилирования ДНК в мозге плодов с дефектами нервной трубки коррелировало с пониженным уровнем фолиевой кислоты и витамина B<sub>12</sub> в крови матерей [71].

Влияние ПГГЦ на уровень метилирования ДНК в мозге плодов/новорождённых в экспериментальных моделях изучено недостаточно. В одном из исследований показано, что недостаток или избыток фолатов в пище беременных самок мышей не изменяет уровень общего метилирования ДНК в мозге их новорождённого потомства, что указывает на наличие гомеостатических механизмов, поддерживающих относительную стабильность этого показателя в развивающемся мозге, возможно, за счёт использования других доноров метильных групп [72]. При более выраженном недостатке в пище метильных доноров (фолатов, витамина B<sub>12</sub> и холина) у самок крыс развивалась ГЦ, сопровождавшаяся снижением в мозге плодов (E20) общего уровня метилирования ДНК, а также отношения SAM/SAH [73].

Более многочисленные исследования, в которых моделировалась ГЦ различного генеза у взрослых животных, свидетельствуют об изменениях под влиянием хронической ГЦ содержания ДНК-метилтрансфераз, общего метилирования ДНК, метилирования CpG-богатых регуляторных областей и промоторов отдельных генов в мозге, что, по мнению авторов, может приводить к нейродегенеративным нарушениям [74–77].

Предполагается, что ПГГЦ может также влиять на репарацию ДНК. У потомства самок мышей, получавших диету с дефицитом фолиевой кислоты, в зрелом возрасте наблюдалось снижение в головном мозге активности системы эксцизионной репарации оснований, способное привести к нейродегенерации за счёт увеличения чувствительности ДНК к окислительному повреждению, на что указывает повышенное содержание биомаркера окислительного стресса 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозина в подкорковых областях мозга [78].

Следует отметить, что в процессе физиологического развития общий уровень метилирования ДНК, а также степень метилирования отдельных генов претерпевают изменения, динамика которых в различных отделах мозга и роль в процессах его морфологического и функционального созревания пока недостаточно иссле-

дованы [71]. Это делает невозможным в настоящее время выдвигать чёткие предположения о функциональных последствиях изменений под влиянием ПГГЦ характера метилирования ДНК в отдельных областях мозга в определенный период его развития. При текущем уровне знаний по данному вопросу учёные могут только констатировать, что ПГГЦ путём воздействия на уровень метилирования ДНК может приводить к изменению программы развития мозга плода [47].

Помимо воздействия на степень метилирования ДНК, ПГГЦ может также оказывать влияние на экспрессию генов через изменение уровней микроРНК. Дефицит метильных доноров в пище матерей во время беременности и связанная с ним материнская ГГЦ вызывают повышение в мозге плодов (E20) уровня микроРНК *let-7a* и *miR-34a* [73]. *Let-7* оказывает воздействие на регуляторные пути, контролирующие пролиферацию и дифференцировку нервных клеток, тесно связанные с возникновением дефектов нервной трубки. Гены-мишени, на которые воздействует *miR-34a*, вовлечены в регуляцию клеточного цикла, апоптоза, дифференцировки и поддержания функций нейронов. Повышение уровня *miR-34a* в мозге новорождённых крысят, матери которых получали пищу с дефицитом фолатов, сопровождалось усилением апоптоза в коре и гиппокампе [63]. К моменту отнятия от груди (P21) у потомства матерей с пищевым дефицитом метильных доноров наблюдалось снижение содержания в мозге *miR-34a*, а также *miR-23*, являющейся, помимо регуляции клеточной пролиферации и апоптоза, ключевым фактором миелинизации [47].

ПГГЦ оказывает влияние на экспрессию в мозге плода нейротрофических факторов, имеющих ключевое значение для развития мозга и процессов обучения и памяти [64, 79]. В мозге плодов (E20) крыс, перенёвших ПГГЦ, наблюдалось снижение отношения зрелой формы нейротрофического фактора мозга BDNF (*mBDNF*) к его предшественнику, что может быть связано с нарушением процессинга BDNF до зрелой формы [64]. Не исключено также влияние ПГГЦ на уровень транскрипции гена *BDNF* посредством изменения уровня его метилирования [80, 81]. Раздельное изучение воздействия ПГГЦ на содержание в мозге *mBDNF* и его предшественника (*proBDNF*) имеет важное значение, поскольку *proBDNF*, в противоположность *mBDNF*, оказывает негативное влияние на выживание и функционирование нейронов и развитие синаптической пластичности [82], а нарушение процессинга *proBDNF* может вносить вклад в развитие нейродегенератив-

ных патологий [83]. Снижение уровня зрелых форм BDNF и фактора роста нервов (NGF) наблюдалось после ПГГЦ в мозге потомства к моменту прекращения лактации (P21), что авторы связывают со снижением числа нейронов в мозге [84]. Сниженное содержание BDNF и NGF сохранялось в гиппокампе взрослого потомства крыс F1, развитие которого происходило в условиях недостатка фолиевой кислоты [85].

### ВОЗДЕЙСТВИЕ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ НА МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ СОЗРЕВАНИЕ МОЗГА И АКТИВНОСТЬ НЕЙРОМЕДИАТОРНЫХ СИСТЕМ

Отмечаемые в литературных источниках поведенческие отклонения у потомства, перенёвшего ПГГЦ, чаще всего не сопоставляются с изменениями клеточного состава в структурах мозга, ответственных за когнитивные функции. Поэтому вопрос о механизмах возникновения когнитивной дисфункции под влиянием ПГГЦ на сегодняшний день остаётся актуальным и требует дальнейших исследований.

В мозге новорождённых крысят ПГГЦ вызывала снижение уровня молекул адгезии нервных клеток NCAM (вовлечены в процессы синаптогенеза, нейрональной пластичности и формирование памяти), глиального фибриллярного кислого белка GFAP (маркёр созревания астроцитов), а также глиального белка S100B (участвует в дифференциации и созревании нейронов), что позволяет предположить задержку развития мозга [38, 49]. Известно, что гиппокамп и кора участвуют в формировании и консолидации памяти. К моменту прекращения лактации (P21) у потомства крыс и мышей, развивавшегося в условиях ПГГЦ, связанной с дефицитом в материнской пище метильных доноров, наряду со снижением общей массы мозга наблюдалось снижение толщины различных слоёв гиппокампа (CA1, CA3, зубчатой извилины и субвентрикулярной зоны) [47]. Другими авторами было показано, что у крысят того же возраста, перенёвших ПГГЦ, число нейронов в цельном мозге [51] и, в частности в теменной коре [66], было снижено по сравнению с контрольными животными.

Обнаруженная многими исследователями когнитивная дисфункция, вызванная перенесённой ПГГЦ, может являться следствием нарушения нейромедиаторной передачи в мозге, и особенно в гиппокампе. У плодов (E17,5) мышей с псевдодефицитом МТГФР, вызванным избыточным потреблением фолиевой кислоты,

наблюдалось снижение содержания бетаина и холина в печени, сопровождавшееся снижением экспрессии ацетилхолинэстеразы в коре мозга, что через влияние на метаболизм ацетилхолина может способствовать ухудшению когнитивных функций, наблюдаемому у потомства в данной экспериментальной модели [86]. В гиппокампе потомства (P21) самок мышей с генетическим дефицитом МТГФР или пищевым дефицитом фолатов показано повышение содержания холинацетилтрансферазы и снижение уровня бетаина, что также свидетельствует об изменении биосинтеза ацетилхолина [46].

У половозрелых самок крыс F1 (P60–P75), перенёсших ПГГЦ, установлено достоверное снижение уровня серотонина и норадреналина в гиппокампе [42], возможно, вследствие увеличения активности моноаминоксидазы [87], что коррелировало со снижением числа правильных посещений рукавов в восьмилучевом лабиринте. Полученные данные согласуются с результатами других исследований о том, что повышение концентрации ГЦ вследствие диеты, обеднённой фолатами, приводит к понижению уровня серотонина и 5-оксииндолуксусной кислоты и изменению нейрогенеза в гиппокампе мышей [88].

Наряду с этим, показано истощение содержания катехоламинов в надпочечниках [89] и повышение уровня норадреналина и адреналина в крови потомства крыс после перенесённой ПГГЦ [87], что может быть причиной развития тревожного состояния и увеличения ошибок в процессе обучения.

ПГГЦ может оказывать влияние на нейромедиаторные системы не только в гиппокампе, но также и в других структурах мозга, в частности, в гипоталамусе. Так, у половозрелых самок крыс F1 (P75), подвергнутых воздействию ПГГЦ, отмечалось снижение содержания норадреналина и повышение уровня дофамина в областях гипоталамуса, ответственных за формирование преовуляторного пика секреции гонадотропин-рилизинг-гормона: медиальной преоптической области и срединном возвышении с аркуатными ядрами [90]. Под влиянием ПГГЦ, вызванной дефицитом в пище доноров метильных групп, у потомства крыс (P21) наблюдалось изменение уровня экспрессии в гипоталамусе проопиомеланокортина и других нейропептидов, вовлечённых одновременно в регуляцию метаболизма и репродуктивной функции [91].

Таким образом, среди факторов, обуславливающих развитие когнитивной дисфункции у потомства под влиянием ПГГЦ, можно выделить активацию в клетках мозга плода/новорождённого окислительного стресса и апоптоза,

индукцию нейровоспалительной реакции, изменение экспрессии генов путём влияния на степень метилирования ДНК и уровни различных микроРНК, изменение содержания нейротрофических факторов, вызывающее замедление роста и дифференцировки нейронов, что в совокупности приводит к задержке созревания отдельных структур и нейромедиаторных систем мозга, а также десинхронизации программы его развития.

### **ВЛИЯНИЕ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ МАТЕРИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ПЛАЦЕНТЫ**

Когнитивные нарушения у потомства при воздействии ПГГЦ могут быть обусловлены не только прямым воздействием ГЦ и его метаболитов на ЦНС плода, но и изменением под влиянием материнской ГЦ функционального состояния плаценты, в том числе её барьерной и транспортной функции [92]. Плацента обеспечивает плод жизненно важными питательными соединениями и кислородом, и нарушение её формирования напрямую отражается на развитии плода и новорождённого. Вместе с тем до настоящего времени влиянию повышенного уровня ГЦ на нормальное развитие и созревание плаценты уделялось недостаточно внимания. В этой связи большой интерес представляет выявление наиболее подверженных токсическому воздействию ГЦ показателей функционального состояния плаценты.

Имеющиеся экспериментальные данные позволяют предполагать, что на уровне плаценты реализуются молекулярные механизмы воздействия ГЦ, сходные с другими тканями: активация окислительного стресса и апоптоза [26, 58, 93–95], а также эпигенетические эффекты, осуществляемые путём изменения уровня микроРНК и степени метилирования ДНК [96–100].

К возможным морфологическим мишеням ГЦ в плаценте в первую очередь относится плацентарный ангиогенез [95, 101, 102]. В этом аспекте достаточно хорошо изучено негативное воздействие повышенных концентраций ГЦ на эндотелиальные клетки, приводящее к их повреждению и дисфункции [103]. Одним из косвенных доказательств воздействия ГЦ на ангиогенез в плаценте служит тот факт, что ГЦ рассматривается в качестве фактора риска задержки роста плода и преэклампсии [104–106], причиной которых при их плацентарной этиологии считается недостаточное ремоделирование спиральных артерий плаценты [107, 108].

Наблюдающиеся при опосредуемых плацентой осложнениях беременности нарушения микроциркуляции, тромбозы сосудов и инфаркты плаценты [107, 108] могут быть связаны с развивающимся под влиянием ГГЦ протромботическим состоянием [109]. Отмечено, что дисфункция эндотелия при ГГЦ проявляется, в частности, в угнетении его антикоагулянтных и активации прокоагулянтных свойств [110]. Результаты клинических исследований указывают на то, что факторы риска развития тромбоза, в том числе повышенный уровень ГЦ, одновременно являются факторами риска развития плацентарной васкулопатии [111]. Стимулирование тромбообразования в плаценте под влиянием ГГЦ может вызывать нарушения материнского плацентарного кровотока, приводя к снижению поступления к плоду кислорода и питательных веществ.

Сравнительно недавно были получены данные, позволяющие предположить участие нейротрофических факторов в развитии и функционировании плаценты [112]. Экспрессия нейротрофинов и их рецепторов обнаружена в клетках трофобласта (плодовая часть плаценты) и децидуальной оболочки (материнская часть плаценты) [113, 114, 115], показано, что BDNF, связываясь со своим рецептором TrkB, стимулирует пролиферацию и снижает уровень апоптоза клеток трофобласта [114]. Это подтверждает предположение об участии нейротрофинов в процессах имплантации и формирования плаценты, а также становлении трансплацентарного барьера. Предполагается, что такие нейротрофические факторы, как BDNF и NGF, играют существенную роль в регуляции плацентарного ангиогенеза, оказывая влияние на экспрессию фактора роста эндотелия сосудов VEGF и активность матриксных металлопротеиназ [112, 114]. Экспрессия BDNF и его рецептора повышалась в плаценте при воздействии окислительного стресса, задержке роста плода и преэклампсии, что позволяет предположить его защитную роль при стрессорных воздействиях, связанных с осложнениями беременности [113]. Под воздействием ГГЦ в плаценте самок крыс наблюдалось повышение уровней предшественников факторов BDNF и NGF, что может отражать усиление их синтеза как компенсаторную реакцию в ответ на плацентарную недостаточность, вызванную ГГЦ [64]. Предполагается, что плацентарные нейротрофины, помимо воздействия непосредственно на плаценту, могут поступать к плоду, оказывая влияние на его рост и развитие [116].

Основной причиной задержки внутриутробного роста плода является недостаток поступления к нему питательных веществ через плаценту. Благодаря активным биосинтетическим процес-

сам организм плода/новорождённого характеризуется повышенной потребностью в свободных аминокислотах. Снижение содержания Leu, Lys, Trp, Phe, Arg, Glu, Gly, Ala и Pro является фактором риска нарушений физического развития, процессов возбуждения и торможения в ЦНС, экспрессии структурных и регуляторных генов [117]. Несмотря на большое количество экспериментальных данных по исследованию аминокислотных профилей в различных тканях под воздействием постнатальной ГГЦ, влияние материнской ГГЦ на трансплацентарный транспорт свободных аминокислот и других питательных веществ от матери к плоду остаётся малоизученным. Для активного транспорта метионина и ГЦ через плацентарный барьер используются те же транспортёры, что и для других аминокислот. Предполагается, что при высоких концентрациях метионина и ГЦ в крови матери может возникать конкуренция за аминокислотные транспортёры, приводящая к задержке поступления прочих аминокислот к плоду, что ведёт к снижению синтеза белка у плода и его пониженному весу при рождении [92, 118, 119]. Действительно, при потреблении беременными крысами больших доз метионина отмечалось значительное снижение веса их новорождённых детёнышей [64, 120, 121]. Кроме того, для удаления избытка ГЦ используются реакции, требующие расходования молекул глицина и серина (рисунок), что может привести к недостатку поступления к мозгу плода этих необходимых для его развития аминокислот, уровень которых в крови матери к концу беременности снижен вследствие повышенного их потребления развивающимся плодом [122].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая изложенное выше, можно предположить, что ПГГЦ посредством индукции в мозге плода/новорождённого окислительного стресса, активации апоптоза и нейровоспалительной реакции, сопровождающихся изменением экспрессии нейротрофинов и уровня микроРНК, обуславливает замедление роста и созревания отдельных структур и нейромедиаторных систем мозга, а также десинхронизацию программы его развития. Нарушение развития мозга под влиянием ПГГЦ приводит к когнитивной дисфункции, проявляющейся уже в ранний постнатальный период развития и сохраняющейся во взрослом возрасте.

Важное значение для пренатального развития мозга плода имеет своевременное поступление к нему необходимых питательных веществ и

кислорода посредством плацентарного транспорта, который зависит от сформированности плацентарной сосудистой сети и активности транспортёров на уровне трансплацентарного барьера между кровообращением матери и плода. Предполагается, что снижение транспортной и барьерной функции плаценты может вносить дополнительный вклад в реализацию негативных эффектов ПГГЦ на развитие и функции ЦНС потомства.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-015-00099) и Госзадания (АААА-А19-119021290116-1).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Boersma, G. J., Bale, T. L., Casanello, P., Lara, H. E., Lucion, A. B., et al. (2014) Long-term impact of early life events on physiology and behaviour, *J. Neuroendocrinol.*, **26**, 587-602, doi: 10.1111/jne.12153.
- Entringer, S., Buss, C., and Wadhwa, P. D. (2015) Prenatal stress, development, health and disease risk: a psychobiological perspective-2015 Curt Richter Award Paper, *Psychoneuroendocrinology*, **62**, 366-75, doi: 10.1016/j.psyneuen.2015.08.019.
- Bolton, J. L., and Bilbo, S. D. (2014) Developmental programming of brain and behavior by perinatal diet: focus on inflammatory mechanisms, *Dialogues Clin. Neurosci.*, **16**, 307-320.
- Buss, C., Entringer, S., and Wadhwa, P. D. (2012) Fetal programming of brain development: intrauterine stress and susceptibility to psychopathology, *Sci. Signal.*, **5**, pt7, doi: 10.1126/scisignal.2003406.
- Cottrell, E. C., Seckl, J. R., Holmes, M. C., and Wyrwoll, C. S. (2014) Foetal and placental 11beta-HSD2: a hub for developmental programming, *Acta Physiol. (Oxf)*, **210**, 288-95, doi: 10.1111/apha.12187.
- Marques, A. H., Bjorke-Monsen, A. L., Teixeira, A. L., and Silverman, M. N. (2015) Maternal stress, nutrition and physical activity: impact on immune function, CNS development and psychopathology, *Brain Res.*, **1617**, 28-46, doi: 10.1016/j.brainres.2014.10.051.
- Williams, J. H., and Ross, L. (2007) Consequences of prenatal toxin exposure for mental health in children and adolescents: a systematic review, *Eur. Child Adolesc. Psychiatry*, **16**, 243-53, doi: 10.1007/s00787-006-0596-6.
- Boldyrev, A. A. (2009) Molecular mechanisms of homocysteine toxicity, *Biochemistry (Moscow)*, **74**, 589-598, doi: 10.1134/s0006297909060017.
- Troen, A. M. (2005) The central nervous system in animal models of hyperhomocysteinemia, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **29**, 1140-1151, doi: 10.1016/j.pnpbp.2005.06.025.
- Cascalheira, J. F., Parreira, M. C., Viegas, A. N., Faria, M. C., and Domingues, F. C. (2008) Serum homocysteine: relationship with circulating levels of cortisol and ascorbate, *Ann. Nutr. Metab.*, **53**, 67-74, doi: 10.1159/000158636.
- Stoney, C. M. (1999) Plasma homocysteine levels increase in women during psychological stress, *Life Sci.*, **64**, 2359-65, doi: 10.1016/s0024-3205(99)00189-7.
- Tallosa, J., Bicikova, M., Hill, M., Tomandl, J., and Valentova, D. (2003) Homocysteine during the menstrual cycle in depressive women, *Eur. J. Clin. Invest.*, **33**, 268-273, doi: 10.1046/j.1365-2362.2003.01087.x.
- Zhao, Y., Wu, S., Gao, X., Zhang, Z., Gong, J., et al. (2013) Inhibition of cystathionine beta-synthase is associated with glucocorticoids over-secretion in psychological stress-induced hyperhomocysteinemia rat liver, *Cell Stress Chaperones*, **18**, 631-641, doi: 10.1007/s12192-013-0416-0.
- Selhub, J. (1999) Homocysteine metabolism, *Annu. Rev. Nutr.*, **19**, 217-246, doi: 10.1146/annurev.nutr.19.1.217.
- Gueant, J. L., Namour, F., Gueant-Rodriguez, R. M., and Daval, J. L. (2013) Folate and fetal programming: a play in epigenomics? *Trends Endocrinol. Metab.*, **24**, 279-289, doi: 10.1016/j.tem.2013.01.010.
- Hannibal, L., and Blom, H. J. (2017) Homocysteine and disease: causal associations or epiphenomenons? *Mol. Aspects Med.*, **53**, 36-42, doi: 10.1016/j.mam.2016.11.003.
- James, S. J., Melnyk, S., Pogribna, M., Pogribny, I. P., and Caudill, M. A. (2002) Elevation in S-adenosylhomocysteine and DNA hypomethylation: potential epigenetic mechanism for homocysteine-related pathology, *J. Nutr.*, **132**, 2361S-2366S, doi: 10.1093/jn/132.8.2361S.
- Yang, Q., and He, G. W. (2019) Imbalance of homocysteine and H<sub>2</sub>S: significance, mechanisms, and therapeutic promise in vascular injury, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2019**, 7629673, doi: 10.1155/2019/7629673.
- Skovierova, H., Vidomanova, E., Mahmood, S., Sopkova, J., Drgova, A., et al. (2016) The molecular and cellular effect of homocysteine metabolism imbalance on human health, *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, doi: 10.3390/ijms17101733.
- Vitvitsky, V., Thomas, M., Ghorpade, A., Gendelman, H. E., and Banerjee, R. (2006) A functional transsulfuration pathway in the brain links to glutathione homeostasis, *J. Biol. Chem.*, **281**, 35785-35793, doi: 10.1074/jbc.M602799200.
- Kamat, P. K., Kyles, P., Kalani, A., and Tyagi, N. (2016) Hydrogen sulfide ameliorates homocysteine-induced Alzheimer's disease-like pathology, blood-brain barrier disruption, and synaptic disorder, *Mol. Neurobiol.*, **53**, 2451-2467, doi: 10.1007/s12035-015-9212-4.
- Kumar, M., Modi, M., and Sandhir, R. (2017) Hydrogen sulfide attenuates homocysteine-induced cognitive deficits and neurochemical alterations by improving endogenous hydrogen sulfide levels, *Biofactors*, **43**, 434-450, doi: 10.1002/biof.1354.
- Kumar, M., and Sandhir, R. (2019) Hydrogen sulfide suppresses homocysteine-induced glial activation and inflammatory response, *Nitric Oxide*, **90**, 15-28, doi: 10.1016/j.niox.2019.05.008.
- Patel, D., Rathinam, M., Jarvis, C., Mahimainathan, L., Henderson, G., et al. (2018) Role for cystathionine gamma lyase (CSE) in an ethanol (E)-induced lesion in fetal brain GSH homeostasis, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, doi: 10.3390/ijms19051537.
- Borowczyk, K., Shih, D. M., and Jakubowski, H. (2012) Metabolism and neurotoxicity of homocysteine thiolactone in mice: evidence for a protective role of paraox-



- onase 1, *J. Alzheimer's Dis.*, **30**, 225-231, doi: 10.3233/JAD-2012-111940.
26. Kamudhamas, A., Pang, L., Smith, S. D., Sadosky, Y., and Nelson, D. M. (2004) Homocysteine thiolactone induces apoptosis in cultured human trophoblasts: a mechanism for homocysteine-mediated placental dysfunction? *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **191**, 563-571, doi: 10.1016/j.ajog.2004.01.037.
  27. Perla-Kajan, J., and Jakubowski, H. (2012) Paraoxonase 1 and homocysteine metabolism, *Amino Acids*, **43**, 1405-1417, doi: 10.1007/s00726-012-1321-z.
  28. Sharma, G. S., Kumar, T., Dar, T. A., and Singh, L. R. (2015) Protein N-homocysteinylation: from cellular toxicity to neurodegeneration, *Biochim. Biophys. Acta*, **1850**, 2239-45, doi: 10.1016/j.bbagen.2015.08.013.
  29. Herrmann, W., and Obeid, R. (2011) Homocysteine: a biomarker in neurodegenerative diseases, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **49**, 435-441, doi: 10.1515/CCLM.2011.084.
  30. Sharma, M., Tiwari, M., and Tiwari, R. K. (2015) Hyperhomocysteinemia: impact on neurodegenerative diseases, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **117**, 287-296, doi: 10.1111/bcpt.12424.
  31. Kamat, P. K., Vacek, J. C., Kalani, A., and Tyagi, N. (2015) Homocysteine induced cerebrovascular dysfunction: a link to Alzheimer's disease etiology, *Open Neurol. J.*, **9**, 9-14, doi: 10.2174/1874205X01509010009.
  32. Azzini, E., Ruggeri, S., and Polito, A. (2020) Homocysteine: Its possible emerging role in at-risk population groups, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, doi: 10.3390/ijms21041421.
  33. Zhuo, J. M., Wang, H., and Pratico, D. (2011) Is hyperhomocysteinemia an Alzheimer's disease (AD) risk factor, an AD marker, or neither? *Trends Pharmacol. Sci.*, **32**, 562-571, doi: 10.1016/j.tips.2011.05.003.
  34. Weekman, E. M., Sudduth, T. L., Price, B. R., Woolums, A. E., Hawthorne, D., et al. (2019) Time course of neuropathological events in hyperhomocysteinemic amyloid depositing mice reveals early neuroinflammatory changes that precede amyloid changes and cerebrovascular events, *J. Neuroinflammation*, **16**, 284, doi: 10.1186/s12974-019-1685-z.
  35. Degroote, S., Hunting, D., and Takser, L. (2018) Periconceptional folate deficiency leads to autism-like traits in Wistar rat offspring, *Neurotoxicol. Teratol.*, **66**, 132-138, doi: 10.1016/j.ntt.2017.12.008.
  36. Jozefczuk, J., Kasprzycka, W., Czarnecki, R., Graczyk, A., Jozefczuk, P., et al. (2017) Homocysteine as a diagnostic and etiopathogenic factor in children with autism spectrum disorder, *J. Med. Food*, **20**, 744-749, doi: 10.1089/jmf.2016.0150.
  37. James, S. J., Melnyk, S., Jernigan, S., Pavliv, O., Trusty, T., et al. (2010) A functional polymorphism in the reduced folate carrier gene and DNA hypomethylation in mothers of children with autism, *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet.*, **153B**, 1209-1220, doi: 10.1002/ajmg.b.31094.
  38. Baydas, G., Koz, S. T., Tuzcu, M., Nedzvetsky, V. S., and Etem, E. (2007) Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by high methionine diet on the learning and memory performance in offspring, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **25**, 133-139, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2007.03.001.
  39. Koz, S. T., Gouwy, N. T., Demir, N., Nedzvetsky, V. S., Etem, E., and Baydas, G. (2010) Effects of maternal hyperhomocysteinemia induced by methionine intake on oxidative stress and apoptosis in pup rat brain, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **28**, 325-329, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2010.02.006.
  40. Blaise, S. A., Nedelec, E., Schroeder, H., Alberto, J. M., Bossenmeyer-Pourie, C., et al. (2007) Gestational vitamin B deficiency leads to homocysteine-associated brain apoptosis and alters neurobehavioral development in rats, *Am. J. Pathol.*, **170**, 667-679, doi: 10.2353/ajpath.2007.060339.
  41. Arutjunyan, A., Kozina, L., Stvolinskiy, S., Bulygina, Y., Mashkina, A., and Khavinson, V. (2012) Pinealon protects the rat offspring from prenatal hyperhomocysteinemia, *Int. J. Clin. Exp. Med.*, **5**, 179-185.
  42. Shcherbitskaya, A. D., Milyutina, Y. P., Zaloznyaya, I. V., Arutjunyan, A. V., Nalivaeva, N. N., and Zhuravin, I. A. (2017) The effects of prenatal hyperhomocysteinemia on the formation of memory and the contents of biogenic amines in the rat hippocampus, *Neurochem. J.*, **11**, 296-301, doi: 10.1134/s1819712417040080.
  43. Ars, C. L., Nijs, I. M., Marroun, H. E., Muetzel, R., Schmidt, M., et al. (2019) Prenatal folate, homocysteine and vitamin B12 levels and child brain volumes, cognitive development and psychological functioning: The Generation R Study, *Br. J. Nutr.*, **122**, S1-S9, doi: 10.1017/s0007114515002081.
  44. Yakovleva, O. V., Ziganshina, A. R., Dmitrieva, S. A., Arslanova, A. N., Yakovlev, A. V., et al. (2018) Hydrogen sulfide ameliorates developmental impairments of rat offspring with prenatal hyperhomocysteinemia, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2018**, 2746873, doi: 10.1155/2018/2746873.
  45. Yakovleva, O. V., Ziganshina, A. R., Gerasimova, E. V., Arslanova, A. N., Yarmiev, I. Z., et al. (2019) Influence of group B vitamins on the early development of pup rats with prenatal hyperhomocysteinemia, *Sechenov Ros. Fiziologich. Zhurn.*, **105**, 1247-1261, doi: 10.1134/S086981391910011X.
  46. Jadavji, N. M., Deng, L., Malysheva, O., Caudill, M. A., and Rozen, R. (2015) MTHFR deficiency or reduced intake of folate or choline in pregnant mice results in impaired short-term memory and increased apoptosis in the hippocampus of wild-type offspring, *Neuroscience*, **300**, 1-9, doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.04.067.
  47. Geoffroy, A., Saber-Cherif, L., Pourie, G., Helle, D., Umoret, R., et al. (2019) Developmental impairments in a rat model of methyl donor deficiency: effects of a late maternal supplementation with folic acid, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, doi: 10.3390/ijms20040973.
  48. Hassan, Z., Coelho, D., Kokten, T., Alberto, J. M., Umoret, R., et al. (2019) Brain susceptibility to methyl donor deficiency: from fetal programming to aging outcome in rats, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, doi: 10.3390/ijms20225692.
  49. Baydas, G., Koz, S. T., Tuzcu, M., and Nedzvetsky, V. S. (2008) Melatonin prevents gestational hyperhomocysteinemia-associated alterations in neurobehavioral developments in rats, *J. Pineal Res.*, **44**, 181-188, doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00506.x.
  50. Figueiro, P. W., de Moreira, D. S., Dos Santos, T. M., Prezzi, C. A., Rohden, F., et al. (2019) The neuroprotective role of melatonin in a gestational hypermethioninemia model, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **78**, 198-209, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2019.08.004.
  51. Schweinberger, B. M., Rodrigues, A. F., Dos Santos, T. M., Rohden, F., Barbosa, S., et al. (2018) Methionine administration in pregnant rats causes memory deficit in the offspring and alters ultrastructure in brain tissue, *Neurotox. Res.*, **33**, 239-246, doi: 10.1007/s12640-017-9830-x.
  52. Yakovleva, O., Bogatova, K., Mukhtarova, R., Yakovlev, A., Shakhmatova, V., et al. (2020) Hydrogen sulfide alleviates anxiety, motor, and cognitive dysfunctions in rats with maternal hyperhomocysteinemia via mitigation of oxidative stress, *Biomolecules*, **10**, doi: 10.3390/biom10070995.
  53. Makhro, A. V., Mashkina, A. P., Solenaya, O. A., Trunova, O. A., Kozina, L. S., et al. (2008) Prenatal hyperhomocys-

- teinemia as a model of oxidative stress of the brain, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **146**, 33-35, doi: 10.1007/s10517-008-0233-0.
54. Berrocal-Zaragoza, M. I., Sequeira, J. M., Murphy, M. M., Fernandez-Ballart, J. D., Abdel Baki, S. G., et al. (2014) Folate deficiency in rat pups during weaning causes learning and memory deficits, *Br. J. Nutr.*, **112**, 1323-1332, doi: 10.1017/S0007114514002116.
  55. Pourie, G., Martin, N., Daval, J. L., Alberto, J. M., Umoret, R., Gueant, J. L., and Bossenmeyer-Pourie, C. (2020) The stimulation of neurogenesis improves the cognitive status of aging rats subjected to gestational and perinatal deficiency of B9-12 vitamins, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, doi: 10.3390/ijms21218008.
  56. Pustygina, A. V., Milyutina, Y. P., Zaloznyaya, I. V., and Arutyunyan, A. V. (2015) Indices of oxidative stress in the brain of newborn rats subjected to prenatal hyperhomocysteinemia, *Neurochem. J.*, **9**, 60-65, doi: 10.1134/s1819712415010079.
  57. Dennery, P. A. (2010) Oxidative stress in development: nature or nurture? *Free Radic. Biol. Med.*, **49**, 1147-1151, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.011.
  58. Shcherbitskaia, A., Milyutina, Y., Zalozniaia, I., Kerkeshko, G., and Arutyunyan, A. (2020) Experimental hyperhomocysteinemia initiates oxidative stress in the mother-placenta-fetus system, *Eur. J. Clin. Invest.*, **50**, 52-53.
  59. Schweinberger, B. M., Schwieder, L., Scherer, E., Sitta, A., Vargas, C. R., and Wyse, A. T. (2014) Development of an animal model for gestational hypermethioninemia in rat and its effect on brain  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase/ $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity and oxidative status of the offspring, *Metab. Brain Dis.*, **29**, 153-60, doi: 10.1007/s11011-013-9451-x.
  60. Makhro, A. V., Mashkina, A. P., Solenaya, O. A., Tyulina, O. V., Bulygina, E. R., et al. (2008) Carnosine protects cells from oxidative stress induced by hyperhomocysteinemia, *Neurochem. J.*, **2**, 202-208, doi: 10.1134/S1819712408030112.
  61. Baydas, G., Ozer, M., Yasar, A., Koz, S. T., and Tuzcu, M. (2006) Melatonin prevents oxidative stress and inhibits reactive gliosis induced by hyperhomocysteinemia in rats, *Biochemistry (Moscow)*, **71 Suppl 1**, S91-S95, doi: 10.1134/s0006297906130153.
  62. Abushik, P. A., Niittykoski, M., Giniatullina, R., Shakirzyanova, A., Bart, G., et al. (2014) The role of NMDA and mGluR5 receptors in calcium mobilization and neurotoxicity of homocysteine in trigeminal and cortical neurons and glial cells, *J. Neurochem.*, **129**, 264-274, doi: 10.1111/jnc.12615.
  63. Li, W., Li, Z., Zhou, D., Zhang, X., Yan, J., and Huang, G. (2019) Maternal folic acid deficiency stimulates neural cell apoptosis via miR-34a associated with Bcl-2 in the rat foetal brain, *Int. J. Dev. Neurosci.*, **72**, 6-12, doi: 10.1016/j.ijdevneu.2018.11.002.
  64. Arutyunyan, A. V., Milyutina, Y. P., Shcherbitskaia, A. D., Kerkeshko, G. O., Zalozniaia, I. V., and Mikhel, A. V. (2020) Neurotrophins of the fetal brain and placenta in prenatal hyperhomocysteinemia, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 248-259, doi: 10.1134/S000629792002008X.
  65. Blaise, S. A., Nedelec, E., Alberto, J. M., Schroeder, H., Audonnet, S., et al. (2009) Short hypoxia could attenuate the adverse effects of hyperhomocysteinemia on the developing rat brain by inducing neurogenesis, *Exp. Neurol.*, **216**, 231-238, doi: 10.1016/j.expneurol.2008.11.020.
  66. Shcherbitskaia, A. D., Vasilev, D. S., Milyutina, Y. P., Tumanova, N. L., Zalozniaia, I. V., et al. (2020) Maternal hyperhomocysteinemia induces neuroinflammation and neuronal death in the rat offspring cortex, *Neurotox. Res.*, **38**, 408-420, doi: 10.1007/s12640-020-00233-w.
  67. Hsiao, E. Y., and Patterson, P. H. (2012) Placental regulation of maternal-fetal interactions and brain development, *Dev. Neurobiol.*, **72**, 1317-1326, doi: 10.1002/dneu.22045.
  68. Bale, T. L., Baram, T. Z., Brown, A. S., Goldstein, J. M., Insel, T. R., et al. (2010) Early life programming and neurodevelopmental disorders, *Biol. Psychiatry*, **68**, 314-319, doi: 10.1016/j.biopsych.2010.05.028.
  69. Da Cunha, A. A., Ferreira, A. G., Loureiro, S. O., da Cunha, M. J., Schmitz, F., et al. (2012) Chronic hyperhomocysteinemia increases inflammatory markers in hippocampus and serum of rats, *Neurochem. Res.*, **37**, 1660-1669, doi: 10.1007/s11064-012-0769-2.
  70. Kim, K. C., Friso, S., and Choi, S. W. (2009) DNA methylation, an epigenetic mechanism connecting folate to healthy embryonic development and aging, *J. Nutr. Biochem.*, **20**, 917-926, doi: 10.1016/j.jnutbio.2009.06.008.
  71. Liu, H. Y., Liu, S. M., and Zhang, Y. Z. (2020) Maternal folic acid supplementation mediates offspring health via DNA methylation, *Reprod. Sci.*, **27**, 963-976, doi: 10.1007/s43032-020-00161-2.
  72. Harlan De Crescenzo, A., Panoutsopoulos, A. A., Tat, L., Schaaf, Z., Racherla, S., et al. (2020) Deficient or excess folic acid supply during pregnancy alter cortical neurodevelopment in mouse offspring, *Cereb. Cortex*, doi: 10.1093/cercor/bhaa248.
  73. Geoffroy, A., Kerek, R., Pourie, G., Helle, D., Gueant, J. L., et al. (2017) Late maternal folate supplementation rescues from methyl donor deficiency-associated brain defects by restoring Let-7 and miR-34 pathways, *Mol. Neurobiol.*, **54**, 5017-5033, doi: 10.1007/s12035-016-0035-8.
  74. Li, J. G., Barrero, C., Gupta, S., Kruger, W. D., Merali, S., and Pratico, D. (2017) Homocysteine modulates 5-lipoxygenase expression level via DNA methylation, *Aging Cell*, **16**, 273-280, doi: 10.1111/acel.12550.
  75. Pogribny, I. P., Karpf, A. R., James, S. R., Melnyk, S., Han, T., and Tryndyak, V. P. (2008) Epigenetic alterations in the brains of Fisher 344 rats induced by long-term administration of folate/methyl-deficient diet, *Brain Res.*, **1237**, 25-34, doi: 10.1016/j.brainres.2008.07.077.
  76. Kalani, A., Kamat, P. K., Familtseva, A., Chaturvedi, P., Muradashvili, N., et al. (2014) Role of microRNA29b in blood-brain barrier dysfunction during hyperhomocysteinemia: an epigenetic mechanism, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **34**, 1212-1222, doi: 10.1038/jcbfm.2014.74.
  77. Kalani, A., Kamat, P. K., Givvimani, S., Brown, K., Metreveli, N., et al. (2014) Nutri-epigenetics ameliorates blood-brain barrier damage and neurodegeneration in hyperhomocysteinemia: role of folic acid, *J. Mol. Neurosci.*, **52**, 202-215, doi: 10.1007/s12031-013-0122-5.
  78. Langie, S. A., Achterfeldt, S., Gorniak, J. P., Halley-Hogg, K. J., Oxley, D., et al. (2013) Maternal folate depletion and high-fat feeding from weaning affects DNA methylation and DNA repair in brain of adult offspring, *FASEB J.*, **27**, 3323-3334, doi: 10.1096/fj.12-224121.
  79. Sahay, A., Kale, A., and Joshi, S. (2020) Role of neurotrophins in pregnancy and offspring brain development, *Neuropeptides*, 102075, doi: 10.1016/j.npep.2020.102075.
  80. Parrish, R. R., Buckingham, S. C., Mascia, K. L., Johnson, J. J., Matyjasik, M. M., et al. (2015) Methionine increases BDNF DNA methylation and improves memory in epilepsy, *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, **2**, 401-416, doi: 10.1002/acn3.183.
  81. Yan, Z., Jiao, F., Yan, X., and Ou, H. (2017) Maternal chronic folate supplementation ameliorates behavior disorders induced by prenatal high-fat diet through methylation alteration of BDNF and Grin2b in offspring hippocampus, *Mol. Nutr. Food Res.*, **61**, doi: 10.1002/mnfr.201700461.
  82. Yang, J., Harte-Hargrove, L. C., Siao, C. J., Marinic, T., Clarke, R., et al. (2014) proBDNF negatively regulates

- neuronal remodeling, synaptic transmission, and synaptic plasticity in hippocampus, *Cell Rep.*, **7**, 796-806, doi: 10.1016/j.celrep.2014.03.040.
83. Gerenu, G., Martisova, E., Ferrero, H., Carracedo, M., Rantamaki, T., et al. (2017) Modulation of BDNF cleavage by plasminogen-activator inhibitor-1 contributes to Alzheimer's neuropathology and cognitive deficits, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1863**, 991-1001, doi: 10.1016/j.bbadis.2017.01.023.
  84. Schweinberger, B. M., Rodrigues, A. F., Turcatel, E., Pierozan, P., Pettenuzzo, L. F., et al. (2018) Maternal hypermethioninemia affects neurons number, neurotrophins levels, energy metabolism, and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase expression/content in brain of rat offspring, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 980-988, doi: 10.1007/s12035-017-0383-z.
  85. Canever, L., Freire, T. G., Mastella, G. A., Damazio, L., Gomes, S., et al. (2018) Changes in behavioural parameters, oxidative stress and neurotrophins in the brain of adult offspring induced to an animal model of schizophrenia: the effects of FA deficient or FA supplemented diet during the neurodevelopmental phase, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **86**, 52-64, doi: 10.1016/j.pnpbp.2018.05.014.
  86. Bahous, R. H., Jadavji, N. M., Deng, L., Cosin-Tomas, M., Lu, J., et al. (2017) High dietary folate in pregnant mice leads to pseudo-MTHFR deficiency and altered methyl metabolism, with embryonic growth delay and short-term memory impairment in offspring, *Hum. Mol. Genet.*, **26**, 888-900, doi: 10.1093/hmg/ddx004.
  87. Shcherbitskaya, A. D., Milyutina, Y. P., Vasil'ev, D. S., Nalivaeva, N. N., Zhuravin, I. A., and Arutyunyan, A. V. (2020) Specific features of metabolism of biogenic amines in the hippocampus and adrenals of rats after prenatal hyperhomocysteinemia, *Zhurn. Evol. Biokhim. Fiziol.*, **56**, 724.
  88. Kronenberg, G., Harms, C., Sobol, R. W., Cardozo-Pelaez, F., Linhart, H., et al. (2008) Folate deficiency induces neurodegeneration and brain dysfunction in mice lacking uracil DNA glycosylase, *J. Neurosci.*, **28**, 7219-7230, doi: 10.1523/jneurosci.0940-08.2008.
  89. Milyutina, Y. P., Arutyunyan, A. V., Pustygina, A. V., Shcherbitskaya, A. D., Zaloznyaya, I. V., and Zorina, I. I. (2014) Catecholamine levels in the adrenals of pup rat pups which underwent prenatal hyperhomocysteinemia, *Sechenov Ross. Fiziol. Zhurn.*, **100**, 360-369.
  90. Arutyunyan, A. V., Zaloznyaya, I. V., Kerkeshko, G. O., Milyutina, Y. P., and Korenevskii, A. V. (2017) Prenatal hyperhomocysteinemia impairs hypothalamic regulation of reproductive cycles in rat progeny, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **162**, 738-740, doi: 10.1007/S10517-017-3701-6.
  91. Saber Cherif, L., Pourie, G., Geoffroy, A., Julien, A., Helle, D., et al. (2019) Methyl donor deficiency during gestation and lactation in the rat affects the expression of neuropeptides and related receptors in the hypothalamus, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, doi: 10.3390/ijms20205097.
  92. Tsietsiou, E., Sibley, C. P., D'Souza, S. W., Catanescu, O., Jacobsen, D. W., and Glazier, J. D. (2011) Homocysteine is transported by the microvillous plasma membrane of human placenta, *J. Inherit. Metab. Dis.*, **34**, 57-65, doi: 10.1007/s10545-010-9141-3.
  93. Di Simone, N., Maggiano, N., Caliandro, D., Riccardi, P., Evangelista, A., et al. (2003) Homocysteine induces trophoblast cell death with apoptotic features, *Biol. Reprod.*, **69**, 1129-1134, doi: 10.1095/biolreprod.103.015800.
  94. Di Simone, N., Riccardi, P., Maggiano, N., Piacentani, A., D'Asta, M., et al. (2004) Effect of folic acid on homocysteine-induced trophoblast apoptosis, *Mol. Hum. Reprod.*, **10**, 665-669, doi: 10.1093/molehr/gah091.
  95. Kasture, V. V., Sundrani, D. P., and Joshi, S. R. (2018) Maternal one carbon metabolism through increased oxidative stress and disturbed angiogenesis can influence placental apoptosis in preeclampsia, *Life Sci.*, **206**, 61-69, doi: 10.1016/j.lfs.2018.05.029.
  96. Kim, J. M., Hong, K., Lee, J. H., Lee, S., and Chang, N. (2009) Effect of folate deficiency on placental DNA methylation in hyperhomocysteinemic rats, *J. Nutr. Biochem.*, **20**, 172-176, doi: 10.1016/j.jnutbio.2008.01.010.
  97. Li, B., Chang, S., Liu, C., Zhang, M., Zhang, L., et al. (2019) Low maternal dietary folate alters retrotranspose by methylation regulation in intrauterine growth retardation (IUGR) fetuses in a mouse model, *Med. Sci. Monit.*, **25**, 3354-3365, doi: 10.12659/MSM.914292.
  98. McGee, M., Bainbridge, S., and Fontaine-Bisson, B. (2018) A crucial role for maternal dietary methyl donor intake in epigenetic programming and fetal growth outcomes, *Nutr. Rev.*, **76**, 469-478, doi: 10.1093/nutrit/nuy006.
  99. Park, B. H., Kim, Y. J., Park, J. S., Lee, H. Y., Ha, E. H., et al. (2005) [Folate and homocysteine levels during pregnancy affect DNA methylation in human placenta], *J. Prev. Med. Public Health*, **38**, 437-442.
  100. Mahajan, A., Sapehia, D., Thakur, S., Mohanraj, P. S., Bagga, R., and Kaur, J. (2019) Effect of imbalance in folate and vitamin B12 in maternal/parental diet on global methylation and regulatory miRNAs, *Sci. Rep.*, **9**, 17602, doi: 10.1038/s41598-019-54070-9.
  101. Li, Y., Gao, R., Liu, X., Chen, X., Liao, X., et al. (2015) Folate deficiency could restrain decidual angiogenesis in pregnant mice, *Nutrients*, **7**, 6425-6445, doi: 10.3390/nu7085284.
  102. Oosterbaan, A. M., Steegers, E. A., and Ursem, N. T. (2012) The effects of homocysteine and folic acid on angiogenesis and VEGF expression during chicken vascular development, *Microvasc. Res.*, **83**, 98-104, doi: 10.1016/j.mvr.2011.11.001.
  103. Lai, W. K., and Kan, M. Y. (2015) Homocysteine-induced endothelial dysfunction, *Ann. Nutr. Metab.*, **67**, 1-12, doi: 10.1159/000437098.
  104. Chen, Y. Y., Gupta, M. B., Grattton, R., Powell, T. L., and Jansson, T. (2018) Down-regulation of placental folate transporters in intrauterine growth restriction, *J. Nutr. Biochem.*, **59**, 136-141, doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.06.003.
  105. Hague, W. M. (2003) Homocysteine and pregnancy, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.*, **17**, 459-469.
  106. Gaiday, A. N., Tussupkaliyev, A. B., Bermagambetova, S. K., Zhumagulova, S. S., Sarsembayeva, L. K., et al. (2018) Effect of homocysteine on pregnancy: a systematic review, *Chem. Biol. Interact.*, **293**, 70-76, doi: 10.1016/j.cbi.2018.07.021.
  107. Burton, G. J., and Jauniaux, E. (2018) Pathophysiology of placental-derived fetal growth restriction, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **218**, S745-S761, doi: 10.1016/j.ajog.2017.11.577.
  108. Burton, G. J., Redman, C. W., Roberts, J. M., and Moffett, A. (2019) Pre-eclampsia: pathophysiology and clinical implications, *BMJ*, **366**, 12381, doi: 10.1136/bmj.12381.
  109. Eldibany, M. M., and Caprini, J. A. (2007) Hyper-homocysteinemia and thrombosis: an overview, *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **131**, 872-884, doi: 10.1043/1543-2165(2007)131[872:HATAO]2.0.CO;2.
  110. Harpel, P. C., Zhang, X., and Borth, W. (1996) Homocysteine and hemostasis: pathogenic mechanisms predisposing to thrombosis, *J. Nutr.*, **126**, 1285S-1289S, doi: 10.1093/jn/126.suppl\_4.1285S.
  111. Van der Molen, E. F., Verbruggen, B., Novakova, I., Eskes, T. K., Monnens, L. A., and Blom, H. J. (2000) Hyperhomocysteinemia and other thrombotic risk factors in women with placental vasculopathy, *BJOG*, **107**, 785-91, doi: 10.1111/j.1471-0528.2000.tb13341.x.

112. Sahay, A. S., Sundrani, D. P., and Joshi, S. R. (2017) Neurotrophins: role in placental growth and development, *Vitam. Horm.*, **104**, 243-261, doi: 10.1016/bs.vh.2016.11.002.
113. Fujita, K., Tatsumi, K., Kondoh, E., Chigusa, Y., Mogami, H., et al. (2011) Differential expression and the anti-apoptotic effect of human placental neurotrophins and their receptors, *Placenta*, **32**, 737-744, doi: 10.1016/j.placenta.2011.07.001.
114. Kawamura, K., Kawamura, N., Sato, W., Fukuda, J., Kumagai, J., and Tanaka, T. (2009) Brain-derived neurotrophic factor promotes implantation and subsequent placental development by stimulating trophoblast cell growth and survival, *Endocrinology*, **150**, 3774-3782, doi: 10.1210/en.2009-0213.
115. Toti, P., Ciarmela, P., Florio, P., Volpi, N., Occhini, R., and Petraglia, F. (2006) Human placenta and fetal membranes express nerve growth factor mRNA and protein, *J. Endocrinol. Invest.*, **29**, 337-341, doi: 10.1007/BF03344105.
116. Mayeur, S., Lukaszewski, M. A., Breton, C., Storme, L., Vieau, D., and Lesage, J. (2011) Do neurotrophins regulate the fetoplacental development? *Med. Hypotheses*, **76**, 726-728, doi: 10.1016/j.mehy.2011.02.008.
117. Akahoshi, N., Yokoyama, A., Nagata, T., Miura, A., Kamata, S., and Ishii, I. (2019) Abnormal amino acid profiles of blood and cerebrospinal fluid from cystathionine beta-synthase-deficient mice, an animal model of homocystinuria, *Biol. Pharm. Bull.*, **42**, 1054-1057, doi: 10.1248/bpb.b19-00127.
118. Jansson, T. (2009) Novel mechanism causing restricted fetal growth: does maternal homocysteine impair placental amino acid transport? *J. Physiol.*, **587**, 4123, doi: 10.1113/jphysiol.2009.178327.
119. Tsitsiou, E., Sibley, C. P., D'Souza, S. W., Catanescu, O., Jacobsen, D. W., and Glazier, J. D. (2009) Homocysteine transport by systems L, A and y+L across the microvillous plasma membrane of human placenta, *J. Physiol.*, **587**, 4001-4013, doi: 10.1113/jphysiol.2009.173393.
120. Mori, M., Yamashita, Y., Hiroi, Y., Shinjo, S., Asato, R., et al. (1999) Effect of single essential amino acid excess during pregnancy on dietary nitrogen utilization and fetal growth in rats, *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, **8**, 251-257, doi: 10.1046/j.1440-6047.1999.00094.x.
121. Matsueda, S., and Niiyama, Y. (1982) The effects of excess amino acids on maintenance of pregnancy and fetal growth in rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **28**, 557-73, doi: 10.3177/jnsv.28.557.
122. Rees, W. D., Wilson, F. A., and Maloney, C. A. (2006) Sulfur amino acid metabolism in pregnancy: the impact of methionine in the maternal diet, *J. Nutr.*, **136**, 1701S-1705S, doi: 10.1093/jn/136.6.1701S.

## PRENATAL STRESS IN MATERNAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA: DISORDERS OF THE DEVELOPMENT OF THE FETAL NERVOUS SYSTEM AND THE FUNCTIONAL STATE OF THE PLACENTA

### Review

A. V. Arutjunyan<sup>1,2\*</sup>, G. O. Kerkeshko<sup>2</sup>, Y. P. Milyutina<sup>1</sup>,  
A. D. Shcherbitskaia<sup>1,3</sup>, and I. V. Zalozniaia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> D. O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, 199034 St. Petersburg, Russia; E-mail: alexarutiunjan@gmail.com

<sup>2</sup> St. Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology, 197110 St. Petersburg, Russia

<sup>3</sup> I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 104223 St. Petersburg, Russia

The article presents current views on maternal hyperhomocysteinemia (HHcy) as an important factor causing prenatal stress and impaired nervous system development in fetuses and newborns in early ontogenesis, as well as complications in adulthood. Experimental data demonstrate that prenatal HHcy (PHHcy) affects the morphological maturation of the brain and activity of its neurotransmitter systems. Cognitive deficit observed in the offspring subjected to HHcy in experimental studies can presumably cause the predisposition to various neurodegenerative diseases, as the role of maternal HHcy in the pathogenesis such diseases has been proven in clinical studies. The review also discusses molecular mechanisms of the HHcy neurotoxic action on the nervous system development in the prenatal and early postnatal periods, which include oxidative stress, apoptosis activation, changes in the DNA methylation patterns and microRNA levels, altered expression and processing of neurotrophins, and neuroinflammation induced by an increased production of pro-inflammatory cytokines. Special attention is given to the maternal HHcy impact on the placenta function and its possible contribution to the brain function impairments in the offspring. Published data suggest that some effects of PHHcy on the developing fetal brain can be due to the disturbances in the transport functions of the placenta resulting in an insufficient supply of nutrients necessary for the proper formation and functioning of brain structures.

**Keywords:** early ontogenesis, fetus, newborn, brain, prenatal (maternal) hyperhomocysteinemia, placenta, angiogenesis, neurogenesis

УДК 577.25

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ПАТОБИОХИМИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ДЕПРЕССИИ И ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ СТРЕССОВОМ РАССТРОЙСТВЕ

### Обзор

© 2021 К.Н. Ступин, М.Ю. Зенько, Е.А. Рыбникова\*

*Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034 Санкт-Петербург, Россия;  
электронная почта: rybnikovaea@infra.ru*

Поступила в редакцию 13.11.2020

После доработки 12.03.2021

Принята к публикации 12.03.2021

В обзоре проводится сравнительный анализ имеющихся в литературе сведений о патогенетических нейро-эндокринных механизмах депрессии и посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) с целью выявления их общности и специфики. Обсуждаются характерные для депрессии и ПТСР модификации активности корковых и подкорковых структур мозга, уровней нейромедиаторов и их рецепторов, функции гипоталамо-гипофизарно-адренортикаральной оси. Проведённый анализ свидетельствует о том, что данные расстройства представляют собой примеры разнонаправленных нарушений в системе адаптивного ответа организма на стрессорные психотравмирующие события. Сравнение патогенетических изменений, сопровождающих данные заболевания, несмотря на значительное сходство их причин и симптоматики, подводит к необходимости разработки дифференциальных терапевтических стратегий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** депрессия, посттравматическое стрессовое расстройство, этиология, патогенетические механизмы, глюкокортикоидные гормоны.

**DOI:** 10.31857/S0320972521060105

### ВВЕДЕНИЕ

Депрессия или большое депрессивное расстройство (БДР) является в настоящее время одним из наиболее распространённых расстройств в мире, причём не только психиатрических. Менее распространённым заболеванием, также имеющим постстрессорную природу, является посттравматическое стрессовое расстройство (ПТСР). Общей чертой, несмотря на большую роль генетической предрасположенности и принадлежность к разным нозологическим группам (F33.2 и F43.1 по МКБ-10 соответственно), является их развитие в результате интенсивных

или хронических стрессорных (психотравмирующих) воздействий, а также целый ряд сходных симптомов. Более того, отмечается высокая степень коморбидности ПТСР и депрессии [1], что указывает на наличие общих этиологических факторов, приводящих к развитию этих состояний. Yehuda и Antelman [2] указывают на то, что для формирования ПТСР или депрессивно-подобного состояния в моделях на животных имеет большое значение продолжительность и интенсивность травмирующего воздействия. При этом кратковременное воздействие высокой интенсивности чаще приводит к развитию ПТСР, тогда как при длительных стрессорных воздействиях небольшой интенсивности развивается депрессивное расстройство. Однако несмотря на ряд общих симптомов и этиологических факторов, эти два состояния имеют большие патофизиологические различия и даже, в какой-то степени, могут быть противопоставлены. Анализ этого вопроса является предметом настоящего обзора, цель которого состоит в том, чтобы продемонстрировать, что рассматриваемые постстрессорные расстройства представляют собой наглядные примеры часто разнонаправленных нарушений в системе адаптивного отве-

---

Принятые сокращения: БДР – большое депрессивное расстройство; ПТСР – посттравматическое стрессовое расстройство; СПРМ – сеть пассивного режима работы мозга; ПФК – префронтальная кора; мПФК – медиальная префронтальная кора; влПФК – вентромедиальная префронтальная кора; длПФК – дорсолатеральная префронтальная кора; ППК – передняя поясная кора; ГР – глюкокортикоидные рецепторы; ГАО – гипоталамо-гипофизарно-адренортикаральная ось; BDNF – нейротрофический фактор мозга; 5-HT<sub>1A</sub> – серотониновые рецепторы 1A-типа; СИОЗС – селективный ингибитор обратного захвата серотонина.

\* Адресат для корреспонденции.

та организма на психотравмирующие события. По нашему мнению, тщательное сравнительное изучение механизмов патогенеза этих состояний будет способствовать объективизации методов их дифференциальной диагностики, созданию селективных терапевтических подходов, выявлению роли индивидуальной и наследственной предрасположенности и её направленной коррекции.

### **СТРУКТУРЫ МОЗГА, ВОВЛЕКАЮЩИЕСЯ В ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ КОНТУРЫ ПРИ ПТСР И ДЕПРЕССИВНОМ РАСТРОЙСТВЕ**

Основными нейронными сетями, изучаемыми в рамках патогенеза БДР и ПТСР, являются кортико-лимбическая и сеть пассивного режима работы мозга (СПРРМ). Последняя включает в себя вентромедиальную (вмПФК) и дорсолатеральную префронтальную кору (длПФК), латеральную теменную и кору задней части поясной извилины с прилежащими участками предклинья.

При БДР в работе СПРРМ, объединяющей орбитофронтальную кору с гипоталамусом, миндалевидным телом и гиппокампом, отмечаются изменения связей между входящими в неё структурами [3]. У пациентов с БДР, даже в стадии ремиссии, наблюдаются выраженные микроструктурные изменения в медиальной ПФК и гиппокампе, объём которого уменьшается, а также увеличение количества волокон, связывающих миндалевидное тело с другими регионами [4, 5, 6]. Помимо снижения объёма гиппокампа при БДР, была обнаружена асимметрия его активности, одновременно с этим наблюдалось усиление кровотока в области ядер миндалевидного тела [7].

В кортико-лимбических сетях изменения затрагивают не только объём серого вещества, но и плотность глиальных клеток, что является характерным для БДР [8]. Увеличение количества связей между миндалевидным телом, гиппокампом и базальными ядрами может объяснять селективное усиление у пациентов с БДР памяти негативных событий по сравнению со здоровыми лицами, у которых подобных изменений не выявлялось [9]. У пациентов с ПТСР описанные изменения, характерные для БДР, в работе кортико-лимбической сети и СПРРМ не наблюдались, однако отмечается нарушение связей коры задней части поясной извилины и предклинья с другими отделами СПРРМ [10].

О вовлеченности ПФК в патогенез рассматриваемых постстрессорных расстройств также

свидетельствуют данные об увеличении у больных БДР кровотока и усилении метаболизма глюкозы в вмПФК, связанной с регуляцией эмоций, а в длПФК были обнаружены противоположные изменения [11]. Значение вмПФК для развития БДР подтверждается исследованием, в котором было обнаружено, что пациенты с повреждённой вмПФК имели меньше баллов по шкале выраженности симптомов депрессии, чем больные с поражением других отделов головного мозга [12]. У пациентов с ПТСР, в отличие от больных БДР, наблюдается уменьшение кровотока в вмПФК [13]. Также есть данные о влиянии степени активности длПФК на выраженность симптомов ПТСР: увеличенная активность длПФК связана с менее выраженными симптомами этого расстройства [14]. Результаты, полученные в экспериментах на животных, свидетельствуют о тормозном влиянии нейронов префронтальной коры на ядра миндалевидного тела [15], что хорошо согласуется с данными об изменении активности этих структур при ПТСР.

В передней поясной коре (ППК) пациентов с БДР отмечается увеличение кровотока и метаболизма глюкозы [16]. С этими результатами согласуются исследования на лабораторных животных. Так, Barthas et al. [17] продемонстрировали вовлеченность ППК в развитие патологии в модели депрессии с хроническим болевым стрессом [17]. При этом оптогенетическая стимуляция нейронов ППК приводила к формированию депрессивно-подобного поведения у интактных животных. Напротив, у пациентов с ПТСР обнаружено снижение интенсивности кровотока в ППК [18]. Таким образом, на уровне корковых структур при данных психических расстройствах наблюдается разнонаправленное изменение активности: усиление при депрессивных расстройствах и угнетение при ПТСР.

Несмотря на вовлечение в патогенез БДР и ПТСР одних и тех же сетей и отделов мозга, изменения, наблюдаемые в них при этих патологиях, носят различный характер, а для некоторых рассмотренных структур эти изменения противоположны.

### **ПЕРЕСТРОЙКИ ГИПОТАЛАМО- ГИПОФИЗАРНО-АДРЕНКОРТИКАЛЬНОЙ ОСИ (ГАО) ПРИ ДЕПРЕССИИ И ПТСР И ИХ СВЯЗЬ С НЕЙРОПЛАСТИЧНОСТЬЮ И ВОСПАЛЕНИЕМ**

В норме небольшие концентрации глюкокортикоидных гормонов связываются с минералокортикоидными рецепторами (MR), а в больших концентрациях, например, при стрессор-

ном ответе — с глюкокортикоидными рецепторами (ГР), через которые посредством отрицательной обратной связи регулируется сила реакции ГГАО в стрессорных условиях. Через обратную связь на уровнях гипофиза, паравентрикулярного ядра гипоталамуса и гиппокампа глюкокортикоиды снижают уровень секреции кортиколиберина и АКТГ, тем самым понижая свой собственный уровень [19].

У пациентов с БДР и ПТСР обнаруживаются многоуровневые изменения работы ГГАО, которые носят специфический характер и воспроизводятся в моделях этих расстройств на животных. При этом для пациентов с БДР характерно повышение содержания кортизола в крови [20] и кортиколиберина в гипоталамусе [21], тогда как у больных ПТСР может отмечаться как нормальный [22], так и сниженный базальный уровень глюкокортикоидов крови [23]. Подобные изменения могут быть вызваны отличиями чувствительности механизмов отрицательной обратной связи: считается, что при ПТСР происходит их сенситизация [24], а при БДР — напротив, десенситизация [25].

Изменения плотности ГР в структурах мозга, вовлечённых в патогенез БДР, полученные при постмортальном исследовании мозга больных, наблюдаются в миндалевидном теле [26] и гиппокампе [27]. Редуцированный уровень ГР у животных в моделях депрессии обнаружен в гиппокампе, ПФК и гипоталамусе [28]. Наблюдаемое снижение количества ГР на фоне повышенного уровня глюкокортикоидов и кортиколиберина отражает феномен down-регуляции.

Хронически повышенный уровень глюкокортикоидов при БДР может объяснять упомянутое ранее уменьшение объёма гиппокампа, для нейронов которого их высокие концентрации считаются токсическими [29]. Возможно, именно вызванные этим снижение силы обратного тормозного влияния гиппокампа на секрецию кортиколиберина в паравентрикулярном ядре гипоталамуса приводят к обнаруженному феномену десенситизации ГГАО. В пользу патогенетической роли гиперкортизолемии при депрессии также свидетельствует факт развития депрессивно-подобной патологии при хроническом введении глюкокортикоидов у экспериментальных животных [30].

Глюкокортикоиды обладают выраженным влиянием на нейропластичность и нейрогенез, они уменьшают экспрессию нейротрофического фактора мозга BDNF [31], содержание которого и так достоверно снижается в разных отделах мозга под действием хронического стресса и наблюдается при БДР и ПТСР [32]. Подобные изменения легли в основу нейропластической

теории развития депрессии, а антидепрессивный эффект серотонинергических препаратов в настоящее время считается BDNF-опосредованным [32, 33].

Помимо влияния на функции ЦНС, подобный длительный высокий уровень глюкокортикоидов изменяет функционирование иммунитета, смещая баланс в сторону хронического воспаления с высоким уровнем провоспалительных цитокинов и, что особенно важно, нейровоспалений, сопровождающих протекание депрессивного расстройства [34]. Введение провоспалительных цитокинов приводит к развитию депрессивно-подобных симптомов [35], а использование липополисахарида является одной из моделей депрессии у животных [36]. Цитокин IL-1 $\beta$ , как и глюкокортикоиды, уменьшает экспрессию BDNF [37]. Как и в случае других изменений, наблюдаемых при депрессии, когда с трудом можно выявить, являются они причиной или следствием заболевания, на основе данного феномена была выдвинута воспалительная теория развития депрессии [38]. Однако в независимости от вторичности или первичности данных изменений они, безусловно, оказывают большое влияние на функционирование ГГАО и протекание депрессии соответственно.

У пациентов с ПТСР при пониженном или неизменном базальном уровне кортизола в крови отмечается повышенный уровень кортиколиберина в спинномозговой жидкости [39]. Аналогично, гиперпродукция гипоталамического кортиколиберина также обнаружена нами в модели ПТСР у крыс [40]. Вместе с тем в моделях ПТСР отмечается up-регуляция количества ГР в мПФК [41] и гиппокампе при их неизменном уровне в ядрах миндалевидного тела [42].

Таким образом, можно сказать, что модификации функции ГГАО при БДР и ПТСР носят характер сложных двунаправленных взаимодействий, что затрудняет их разделение на условно первичные (патогенетические) и вторичные из-за соответствующей перестройки всей системы по механизмам обратных связей. По-видимому, депрессия и в меньшей степени ПТСР, как заболевание, имеющее большую степень гетерогенности по его проявлениям, имеет также гетерогенность сопровождающих его нейроэндокринных нарушений.

### МОДИФИКАЦИИ АКТИВНОСТИ МОНОАМИНЭРГИЧЕСКИХ СИСТЕМ МОЗГА

Моноаминовая теория БДР является наиболее старой из существующих теорий патогенеза

этого расстройства [43]. В литературе накоплено большое количество данных об изменении работы серотонинергических нейронов при БДР у людей [44], а также в моделях депрессивно-подобного состояния на грызунах, где было обнаружено снижение уровня серотонина в ПФК и гиппокампе [45], которое сопровождается компенсаторным повышением экспрессии серотониновых рецепторов в данных структурах [46, 47]. Изменения в дофаминергической системе при БДР включают снижение содержания дофамина и его метаболитов в цереброспинальной жидкости [48] и снижение плотности рецепторов дофамина в прилежащем ядре [49]. В то же время в модели депрессии, вызванной хронической болью, на крысах было показано повышение содержания дофамина в вентральной покрывке [50]. В исследованиях депрессивно-подобного синдрома на экспериментальных животных удалось выявить повышение экспрессии D2-рецепторов дофамина в префронтальной коре [51] и снижение экспрессии D2-рецепторов дофамина в прилежащем ядре [52]. При этом дефицит D2-рецепторов, наблюдаемый в структурах лимбической системы в моделях депрессивно-подобного состояния, восстанавливается при длительном применении трициклического антидепрессанта имипрамина [53].

Повышенная тревожность у крыс в модели ПТСР сопровождается увеличенным уровнем дофамина в ПФК. Известно, что в этой области мозга дофаминергические волокна участвуют в реализации ассоциированного со страхом поведения [54], а также в процессах возникновения эмоционально окрашенной памяти [55], что согласуется с проявлением специфических поведенческих симптомов при ПТСР. При этом есть данные об анксиолитическом действии антагонистов D3-рецепторов дофамина в моделях ПТСР на крысах [56].

Изменения в серотонинергических синапсах, обнаруживаемые в исследованиях пациентов и в моделях ПТСР, более разнородны. Так, показано увеличение плотности серотониновых рецепторов 1A-типа в гиппокампе (5-НТ1А) [57], а также серотониновых рецепторов 2С-типа в миндалевидном теле (5-НТ2С) [58]. В то же время отмечается снижение экспрессии рецепторов 5-НТ1А в поясной извилине и ядрах шва [59]. В ПФК изменений плотности рецепторов 5-НТ1А обнаружено не было [57]. Несмотря на некоторую несогласованность имеющихся данных, в целом при ПТСР отмечается чрезмерная активация серотонинергических синапсов в подкорковых образованиях в ответ на стрессовые воздействия [60].

Снижение содержания норадреналина в мПФК и прилежащем ядре было показано в модели депрессии у экспериментальных животных, причём вещества, способствующие повышению уровня норадреналина, приводили к исчезновению депрессивно-подобного поведения [61]. Таким образом, депрессивное расстройство характеризуется выраженным снижением активности адренергических нейронов, в то время как ПТСР характеризуется активацией этой системы мозга: при этом отмечается повышение уровня норадреналина в условиях хронического и острого стресса в ПФК, гиппокампе и миндалевидном теле [60, 62]. Повышенный уровень норадреналина и его метаболитов в миндалевидном теле также был обнаружен в моделях ПТСР на крысах [63].

На основе моноаминовой теории депрессии было разработано несколько групп антидепрессантов, влияющих на уровни моноаминов, применяющихся и по сей день. Однако терапевтический эффект данных препаратов проявляется отсрочено на несколько недель от начала терапии, несмотря на немедленное воздействие на нейротрансмиссию моноаминов. Кроме того, антидепрессантами являются не все лекарственные средства, повышающие уровни моноаминов в синаптической щели, как, например стимуляторы [64]. Подобные факты свидетельствуют о более сложных и отставленных механизмах антидепрессивного эффекта, в основе которого лежит изменение нейропластичности и реорганизация патологических нейронных связей, а не устранение дисбаланса нейромедиаторов, как это представляется в моноаминовой теории депрессии. Более того, наблюдаемые изменения работы моноаминовой нейротрансмиссии при БДР могут иметь вторичный характер.

### ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ГЛУТАМАТЭРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ МОЗГА

На сегодняшний день накоплено достаточно данных об изменениях в глутаматергической системе, возникающих при депрессивных и посттравматических расстройствах, однако, как и в случае других медиаторных систем, выявить первичность или вторичность наблюдаемых изменений довольно сложно.

Применение кетамина, антагониста NMDA-рецепторов, у людей с БДР приводит к быстрому проявлению его антидепрессивного эффекта [65], дефицит глутамата был обнаружен в мПФК [66], ППК [67] и ядрах миндалевидного тела [68], а также сопровождался повышением



экспрессии NMDA-рецепторов в ядрах миндалевидного тела [69]. В то же время при депрессии обнаружено снижение плотности метаболитных рецепторов и NMDA-рецепторов в мПФК [70]. Наличие антидепрессантного эффекта у кетамина может дополнительно свидетельствовать о вовлечении нарушения глутаматной трансмиссии в патобиохимические механизмы БДР. Кратковременное повышение концентрации глутамата при введении кетамина может приводить к высвобождению BDNF, в свою очередь, влияющего на нейропластичность, нарушенную при БДР [71].

В исследованиях на пациентах с ПТСР отмечено повышение уровня глутамата в плазме крови [72], в затылочно-теменных областях коры больших полушарий [73] и правом гиппокампе [74]. В влПФК, которая, как упоминалось выше, характеризуется снижением активности при ПТСР, отмечается понижение уровня глутамата [75]. В длПФК, проявляющей гиперактивацию, отмечается увеличение плотности метаболитных рецепторов глутамата 5-го типа (mGluR5) [76].

Таким образом, при депрессии отмечается угнетение глутаматергической системы в префронтальной коре, миндалевидном теле и гиппокампе, а изменения, выявленные при ПТСР, в большей степени затрагивают структуры префронтальной коры и характеризуются сенситизацией нейронов этой области к действию глутамата.

## ФАРМАКОТЕРАПИЯ БДР И ПТСР

Первая линия фармакотерапии БДР в подавляющем большинстве случаев представляет собой применение селективных ингибиторов обратного захвата серотонина (СИОЗС) и/или норадреналина. Во вторую и третью линии входят неселективные ингибиторы обратного захвата моноаминов и ингибиторы моноаминоксидазы. Однако эффективность применения антидепрессантов остаётся низкой и часто отличается от плацебо только в случаях тяжёлой депрессии [77]. Для более селективного воздействия на нейропластичность без побочных эффектов, присутствующих у существующих моноаминовых антидепрессантов, в настоящее время разрабатывается класс препаратов «психопластогенов» [78].

Фармакотерапия ПТСР на сегодняшний день носит по большей части симптоматический характер, наиболее часто назначаемыми препаратами являются антидепрессанты класса СИОЗС, однако их эффективность остаётся под вопросом [79]. Некоторые исследователи считают, что применение СИОЗС при ПТСР без наличия коморбидного депрессивного расстройства не имеет практического обоснования [80]. Использование при ПТСР адреноблокаторов, даже преимущественно периферического действия, как празозин [81], имеет смысл для устранения положительной биологической обратной связи, являющейся основой развития панических атак у пациентов с тревожными расстройствами (таблица).

Изменения, обнаруживаемые при депрессии и ПТСР

Эффекты	Большая депрессия	Модели депрессии на животных	ПТСР	Модели ПТСР на животных
Изменение работы СПРРМ	выраженное [3]	выраженное [3]	частичное [10]	
Изменение работы кортико-лимбической сети	выраженное [8, 9]	выраженное [8, 9]	частичное [10]	
Изменение объёма гиппокампа	уменьшение [6]	уменьшение [6]		
Активность ГГАО	десенситизация [25]	десенситизация [25]	сенситизация [24]	сенситизация [24]
ГР в гиппокампе и ПФК	снижение [26, 27]	снижение [28]	повышение [41]	повышение [41]
Нейровоспаление	выраженное [34]	выраженное [35, 36]		
Активность серотонинергической системы	снижение [44]	снижение [45]	повышение [57–59]	повышение [60]
Активность норадрено- и дофаминоергических систем	снижение [48, 61]	снижение [50–52, 61]	повышение [54, 55, 60]	повышение [56, 63]
Изменение активности глутаматергической системы	выраженное [66–68]	снижение [37]	сенситизация [72–74]	
BDNF и нейропластичность	снижение [32, 33, 71]			

Сокращения: СПРРМ – сеть пассивного режима работы мозга; ГГАО – гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальная ось; ГР – глюкокортикоидные рецепторы; ПФК – префронтальная кора; BDNF – нейротрофический фактор мозга.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем обзоре предпринята попытка обобщения и сравнительного анализа накопленных сведений о механизмах патогенеза БДР и ПТСР. Разнообразие вовлечённых нейромедиаторных и нейроэндокринных систем и контуров головного мозга вместе с обилием связей разных модальностей между ними делает обобщение патологических изменений действительно сложной задачей. В целом можно заключить, что данные психические расстройства имеют достаточное количество общих черт (от этиологических факторов до нейромедиаторных и гормональных систем, вовлекающихся в патогенез этих состояний). В то же время очевидно, что по характеру большинства рассмотренных в обзоре патогенетических изменений данные состояния могут быть противопоставлены друг другу, тем

самым применение существующего сходного подхода к фармакотерапии этих разных расстройств выглядит необоснованным. Очевидно, что БДР и ПТСР, как примеры разнонаправленных нарушений в механизмах адаптации к стрессу, требуют разработки дифференциальных подходов к их лечению.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-015-00336).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kessler, R. C., Sonnega, A., Bromet, E., Hughes, M., and Nelson, C. B. (1995) Posttraumatic stress disorder in the National Comorbidity Survey, *Arch. Gen. Psychiatry*, **52**, 1048-1060, doi: 10.1001/archpsyc.1995.03950240066012.
- Yehuda, R., and Antelman, S. M. (1993) Criteria for rationally evaluating animal models of posttraumatic stress disorder, *Biol. Psychiatry*, **33**, 479-486, doi: 10.1016/0006-3223(93)90001-t.
- Li, B., Liu, L., Friston, K. J., Shen, H., Wang, L., et al. (2013) A treatment-resistant default mode subnetwork in major depression, *Biol. Psychiatry*, **74**, 48-54, doi: 10.1016/j.biopsych.2012.11.007.
- Erk, S., Mikschl, A., Stier, S., Ciaramidaro, A., Gapp, V., et al. (2010) Acute and sustained effects of cognitive emotion regulation in major depression, *J. Neurosci.*, **30**, 15726-15734, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1856-10.2010.
- Ma, N., Li, L., Shu, N., Liu, J., Gong, G., et al. (2007) White matter abnormalities in first-episode, treatment-naïve young adults with major depressive disorder, *Am. J. Psychiatry*, **164**, 823-826, doi: 10.1176/ajp.2007.164.5.823.
- Frodil, T., Jäger, M., Smajstrlova, I., Born, C., Bottlender, R., et al. (2008) Effect of hippocampal and amygdala volumes on clinical outcomes in major depression: a 3-year prospective magnetic resonance imaging study, *J. Psychiatry Neurosci.*, **33**, 423.
- Ma, X., Liu, J., Liu, T., Ma, L., Wang, W., et al. (2019) Altered resting-state functional activity in medication-naïve patients with first-episode major depression disorders. Healthy control: a quantitative meta-analysis, *Front. Behav. Neurosci.*, **13**, 89, doi: 10.3389/fnbeh.2019.00089.
- Bennett, M. R. (2011) The prefrontal-limbic network in depression: a core pathology of synapse regression, *Prog. Neurobiol.*, **93**, 457-467, doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.01.001.
- Arnold, J. F., Zwiers, M. P., Fitzgerald, D. A., van Eijndhoven, P., Becker, E. S., et al. (2012) Fronto-limbic microstructure and structural connectivity in remission from major depression, *Psychiatry Res. Neuroimaging*, **204**, 40-48, doi: 10.1016/j.pscychresns.2012.07.010.
- Bluhm, R. L., Williamson, P. C., Osuch, E. A., Frewen, P. A., Stevens, T. K., et al. (2009) Alterations in default network connectivity in posttraumatic stress disorder related to early-life trauma, *J. Psychiatry Neurosci.*, **34**, 187.
- Goldman, S., Mendlewicz, J., Luxen, A., Delvenne, V., Lotstra, F., et al. (1994) Frontal and parietal metabolic disturbances in unipolar depression, *Biol. Psychiatry*, **36**, 381-388, doi: 10.1016/0006-3223(94)91213-0.
- Koenigs, M., Huey, E. D., Calamia, M., Raymond, V., Tranel, D., and Grafman, J. (2008) Distinct regions of prefrontal cortex mediate resistance and vulnerability to depression, *J. Neurosci.*, **28**, 12341-12348, doi: 10.1523/JNEUROSCI.2324-08.2008.
- Bremner, J. D., Staib, L. H., Kaloupek, D., Southwick, S. M., Soufer, R., and Charney, D. S. (1999) Neural correlates of exposure to traumatic pictures and sound in Vietnam combat veterans with and without posttraumatic stress disorder: a positron emission tomography study, *Biol. Psychiatry*, **45**, 806-816, doi: 10.1016/s0006-3223(98)00297-2.
- Aupperle, R. L., Allard, C. B., Grimes, E. M., Simmons, A. N., Flagan, T., et al. (2012) Dorsolateral prefrontal cortex activation during emotional anticipation and neuropsychological performance in posttraumatic stress disorder, *Arch. Gen. Psychiatry*, **69**, 360-371, doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.1539.
- Rosenkranz, J. A., and Grace, A. A. (2002) Cellular mechanisms of infralimbic and prelimbic prefrontal cortical inhibition and dopaminergic modulation of basolateral amygdala neurons *in vivo*, *J. Neurosci.*, **22**, 324-337, doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-01-00324.2002.
- Sundermann, B., Beverborg, M. O., and Pfeleiderer, B. (2014) Toward literature-based feature selection for diagnostic classification: a meta-analysis of resting-state fMRI in depression, *Front. Hum. Neurosci.*, **8**, 692, doi: 10.3389/fnhum.2014.00692.
- Barthas, F., Sellmeijer, J., Hugel, S., Waltisperger, E., Barrot, M., and Yalcin, I. (2015) The anterior cingulate cortex is a critical hub for pain-induced depression, *Biol. Psychiatry*, **77**, 236-245, doi: 10.1016/j.biopsych.2014.08.004.
- Britton, J. C., Phan, K. L., Taylor, S. F., Fig, L. M., and Liberzon, I. (2005) Corticolimbic blood flow in posttraumatic stress disorder during script-driven imagery, *Biol.*

- Psychiatry*, **57**, 832-840, doi: 10.1016/j.biopsych.2004.12.025.
19. De Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., and Joëls, M. (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease, *Endocr. Rev.*, **19**, 269-301, doi: 10.1210/edrv.19.3.0331.
  20. Murri, M. B., Pariante, C., Mondelli, V., Masotti, M., Atti, A. R., et al. (2014) HPA axis and aging in depression: systematic review and meta-analysis, *Psychoneuroendocrinology*, **41**, 46-62, doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.12.004.
  21. Nemeroff, C. B., and Owens, M. J. (2002) Treatment of mood disorders, *Nat. Neurosci.*, **5**, 1068-1070, doi: 10.1038/nn943.
  22. Meewisse, M. L., Reitsma, J. B., de Vries, G. J., Gersons, B. P. R., and Olf, M. (2007) Cortisol and post-traumatic stress disorder in adults: systematic review and meta-analysis, *Br. J. Psychiatry*, **191**, 387-392, doi: 10.1192/bjp.bp.106.024877.
  23. Pan, X., Wang, Z., Wu, X., Wen, S. W., and Liu, A. (2018) Salivary cortisol in post-traumatic stress disorder: a systematic review and meta-analysis, *BMC Psychiatry*, **18**, 324, doi: 10.1186/s12888-018-1910-9.
  24. Franco, A. J., Chen, C., Scullen, T., Zsombok, A., Salahudeen, A. A., et al. (2016) Sensitization of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in a male rat chronic stress model, *Endocrinology*, **157**, 2346-2355, doi: 10.1210/en.2015-1641.
  25. Yehuda, R., Teicher, M. H., Trestman, R. L., Levengood, R. A., and Siever, L. J. (1996) Cortisol regulation in post-traumatic stress disorder and major depression: a chronobiological analysis, *Biol. Psychiatry*, **40**, 79-88, doi: 10.1016/0006-3223(95)00451-3.
  26. Wang, Q., Verweij, E. W. E., Krugers, H. J., Joels, M., Swaab, D. F., and Lucassen, P. J. (2013) Distribution of the glucocorticoid receptor in the human amygdala; changes in mood disorder patients, *Brain Struct. Funct.*, **219**, 1615-1626, doi: 10.1007/s00429-013-0589-4.
  27. Wang, Q., Joels, M., Swaab, D. F., and Lucassen, P. J. (2012) Hippocampal GR expression is increased in elderly depressed females, *Neuropharmacology*, **62**, 527-533, doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.09.014.
  28. Chen, J., Wang, Z., Zuo, W., Zhang, S., Chu, S., and Chen, N. (2016) Effects of chronic mild stress on behavioral and neurobiological parameters – role of glucocorticoid, *Horm. Behav.*, **78**, 150-159, doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.11.006.
  29. Sapolsky, R. M. (1986) Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: reversal by supplementation with brain fuels, *J. Neurosci.*, **6**, 2240-2244, doi: 10.1523/JNEUROSCI.06-08-02240.1986.
  30. Gourley, S. L., Wu, F. J., Kiraly, D. D., Ploski, J. E., Kedves, A. T., et al. (2008) Regionally specific regulation of ERK MAP kinase in a model of antidepressant – sensitive chronic depression, *Biol. Psychiatry*, **63**, 353-359, doi: 10.1016/j.biopsych.2007.07.016.
  31. Numakawa, T., Adachi, N., Richards, M., Chiba, S., and Kunugi, H. (2013) Brain-derived neurotrophic factor and glucocorticoids: reciprocal influence on the central nervous system, *Neuroscience*, **239**, 157-172, doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.09.073.
  32. Lee, B. H., and Kim, Y. K. (2010) The roles of BDNF in the pathophysiology of major depression and in antidepressant treatment, *Psychiatry Invest.*, **7**, 231, doi: 10.4306/pi.2010.7.4.231.
  33. Duman, R. S., and Monteggia, L. M. (2006) A neurotrophic model for stress-related mood disorders, *Biol. Psychiatry*, **59**, 1116-1127, doi: 10.1016/j.biopsych.2006.02.013.
  34. Loftis, J. M., Huckans, M., and Morasco, B. J. (2010) Neuroimmune mechanisms of cytokine-induced depression: current theories and novel treatment strategies, *Neurobiol. Dis.*, **37**, 519-533, doi: 10.1016/j.nbd.2009.11.015.
  35. Capuron, L., and Dantzer, R. (2003) Cytokines and depression: the need for a new paradigm, *Brain Behav. Immun.*, **17**, 119-124, doi: 10.1016/S0889-1591(02)00078-8.
  36. Kubera, M., Curzytek, K., Duda, W., Leskiewicz, M., Basta-Kaim, A., et al. (2013) A new animal model of (chronic) depression induced by repeated and intermittent lipopolysaccharide administration for 4 months, *Brain Behav. Immun.*, **31**, 96-104, doi: 10.1016/j.bbi.2013.01.001.
  37. Barrientos, R. M., Sprunger, D. B., Campeau, S., Higgins, E. A., Watkins, L. R., et al. (2003) Brain-derived neurotrophic factor mRNA downregulation produced by social isolation is blocked by intrahippocampal interleukin-1 receptor antagonist, *Neuroscience*, **121**, 847-853, doi: 10.1016/S0306-4522(03)00564-5.
  38. Smith, R. S. (1991) The macrophage theory of depression, *Med. Hypotheses*, **35**, 298-306, doi: 10.1016/0306-9877(91)90272-Z.
  39. Baker, D. G., West, S. A., Nicholson, W. E., Kasckow, J. W., Hill, K. K., et al. (1999) Corticotropin-releasing hormone levels and adrenocortical activity in combat veterans with posttraumatic stress disorder, *Am. J. Psychiatry*, **156**, 585-588, doi: 10.1176/ajp.156.4.585.
  40. Mironova, V., Rybnikova, E., and Pivina, S. (2013) Effect of inescapable stress in rodent models of depression and posttraumatic stress disorder on CRH and vasopressin immunoreactivity in the hypothalamic paraventricular nucleus, *Acta Physiol. Hung.*, **100**, 395-410, doi: 10.1556/APhysiol.100.2013.4.4.
  41. Wen, L., Han, F., and Shi, Y. (2014) Changes in the glucocorticoid receptor and Ca<sup>2+</sup>/calreticulin-dependent signalling pathway in the medial prefrontal cortex of rats with post-traumatic stress disorder, *J. Mol. Neurosci.*, **56**, 24-34, doi: 10.1007/s12031-014-0464-7.
  42. Eagle, A. L., Knox, D., Roberts, M. M., Mulo, K., Liberzon, I., et al. (2013) Single prolonged stress enhances hippocampal glucocorticoid receptor and phosphorylated protein kinase B levels, *Neurosci. Res.*, **75**, 130-137, doi: 10.1016/j.neures.2012.11.001.
  43. Mulinari, S. (2012) Monoamine theories of depression: historical impact on biomedical research, *J. Hist. Neurosci.*, **21**, 366-392, doi: 10.1080/0964704X.2011.623917.
  44. Andrews, P. W., Bharwani, A., Lee, K. R., Fox, M., and Thomson, J. A. Jr. (2015) Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in depression and the antidepressant response, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **51**, 164-188, doi: 10.1016/j.neubiorev.2015.01.018.
  45. Lu, Q., Mouri, A., Yang, Y., Kunisawa, K., Teshigawara, T., et al. (2019) Chronic unpredictable mild stress-induced behavioral changes are coupled with dopaminergic hyperfunction and serotonergic hypofunction in mouse models of depression, *Behav. Brain Res.*, **372**, 112053, doi: 10.1016/j.bbr.2019.112053.
  46. Ossowska, G., Nowa, G., Kata, R., Klenk-Majewska, B., Danilczuk, Z., and Zebrowska-Lupina, I. (2001) Brain monoamine receptors in a chronic unpredictable stress model in rats, *J. Neural Transm.*, **108**, 311-319, doi: 10.1007/s007020170077.
  47. Garcia-Garcia, A. L., Meng, Q., Canetta, S., Gardier, A. M., Guiard, B. P., et al. (2017) Serotonin signaling through prefrontal cortex 5-HT<sub>1A</sub> receptors during adolescence can determine baseline mood-related behaviors, *Cell Rep.*, **18**, 1144-1156, doi: 10.1016/j.celrep.2017.01.021.
  48. Roy, A., de Jong, J., and Linnoila, M. (1989) Cerebrospinal fluid monoamine metabolites and suicidal behavior

- in depressed patients: a 5-year follow-up study, *Arch. Gen. Psychiatry*, **46**, 609-612, doi: 10.1001/archpsyc.1989.01810070035005.
49. Kram, M. L., Kramer, G. L., Ronan, P. J., Steciuk, M., and Petty, F. (2002) Dopamine receptors and learned helplessness in the rat: an autoradiographic study, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **26**, 639-645, doi: 10.1016/s0278-5846(01)00222-6.
  50. Ji, N. N., Kang, J., Hua, R., and Zhang, Y. M. (2018) Involvement of dopamine system in the regulation of the brain corticotropin-releasing hormone in paraventricular nucleus in a rat model of chronic visceral pain, *Neurol. Res.*, **40**, 650-657, doi: 10.1080/01616412.2018.1460702.
  51. Chen, C., Yang, J. M., Hu, T. T., Xu, T. J., Xu, W. P., and Wei, W. (2013) Elevated dopamine D2 receptor in prefrontal cortex of CUMS rats is associated with downregulated cAMP-independent signaling pathway, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **91**, 750-758, doi: 10.1139/cjpp-2012-0399.
  52. Qiao, H., Yang, S., Xu, C., Ma, X. M., and An, S. C. (2020) Involvement of D2 receptor in the NAc in chronic unpredictable stress-induced depression-like behaviors, *Stress*, **23**, 318-327, doi: 10.1080/10253890.2019.1673361.
  53. Papp, M., Klimek, V., and Willner, P. (1994) Parallel changes in dopamine D2 receptor binding in limbic forebrain associated with chronic mild stress-induced anhedonia and its reversal by imipramine, *Psychopharmacology*, **115**, 441-446, doi: 10.1007/BF02245566.
  54. Shah, A. A., Sjovold, T., and Treit, D. (2004) Selective antagonism of medial prefrontal cortex D4 receptors decreases fear-related behaviour in rats, *Eur. J. Neurosci.*, **19**, 3393-3397, doi: 10.1111/j.0953-816X.2004.03447.x.
  55. Laviolette, S. R., Lipski, W. J., and Grace, A. A. (2005) A subpopulation of neurons in the medial prefrontal cortex encodes emotional learning with burst and frequency codes through a dopamine D<sub>4</sub> receptor-dependent basolateral amygdala input, *J. Neurosci.*, **25**, 6066-6075, doi: 10.1523/JNEUROSCI.1168-05.2005.
  56. Horvitz, J. C., Stewart, T., and Jacobs, B. L. (1997) Burst activity of ventral tegmental dopamine neurons is elicited by sensory stimuli in the awake cat, *Brain Res.*, **759**, 251-258, doi: 10.1016/s0006-8993(97)00265-5.
  57. Harvey, B. H., Naciti, C., Brand, L., and Stein, D. J. (2003) Endocrine, cognitive and hippocampal/cortical 5HT<sub>1A</sub>/2A receptor changes evoked by a time-dependent sensitization (TDS) stress model in rats, *Brain Res.*, **983**, 97-107, doi: 10.1016/s0006-8993(03)03033-6.
  58. Harada, K., Yamaji, T., and Matsuoka, N. (2008) Activation of the serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor is involved in the enhanced anxiety in rats after single-prolonged stress, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **89**, 11-16, doi: 10.1016/j.pbb.2007.10.016.
  59. Neumeister, A., Bain, E., Nugent, A. C., Carson, R. E., Bonne, O., et al. (2004) Reduced serotonin type 1A receptor binding in panic disorder, *J. Neurosci.*, **24**, 589-591, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4921-03.2004.
  60. Krystal, J. H., and Neumeister, A. (2009) Noradrenergic and serotonergic mechanisms in the neurobiology of post-traumatic stress disorder and resilience, *Brain Res.*, **1293**, 13-23, doi: 10.1016/j.brainres.2009.03.044.
  61. Shen, M., Yang, Y., Wu, Y., Zhang, B., Wu, H., et al. (2018) L-theanine ameliorate depressive-like behavior in a chronic unpredictable mild stress rat model via modulating the monoamine levels in limbic-cortical-striatal-pallidal-thalamic-circuit related brain regions, *Phytother. Res.*, **33**, 412-421, doi: 10.1002/ptr.6237.
  62. Bremner, J. D., Krystal, J. H., Southwick, S. M., and Charney, D. S. (1996) Noradrenergic mechanisms in stress and anxiety. I. Preclinical studies, *Synapse*, **23**, 28-38, doi: 10.1002/(SICI)1098-2396(199605)23:1<28::AID-SYN4>3.0.CO;2-J.
  63. Ronzoni, G., Del Arco, A., Mora, F., and Segovia, G. (2016) Enhanced noradrenergic activity in the amygdala contributes to hyperarousal in an animal model of PTSD, *Psychoneuroendocrinology*, **70**, 1-9, doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.04.018.
  64. Bear, M., Connors, B., and Paradiso, M. A. (2020) *Neuroscience: Exploring the Brain*, Jones & Bartlett Learning, Burlington, USA.
  65. Berman, R. M., Cappiello, A., Anand, A., Oren, D. A., Heninger, G. R., et al. (2000) Antidepressant effects of ketamine in depressed patients, *Biol. Psychiatry*, **47**, 351-354, doi: 10.1016/S0006-3223(99)00230-9.
  66. Arnone, D., Mumuni, A. N., Jauhar, S., Condon, B., and Cavanagh, J. (2015) Indirect evidence of selective glial involvement in glutamate-based mechanisms of mood regulation in depression: meta-analysis of absolute prefrontal neuro-metabolic concentrations, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **25**, 1109-1117, doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.04.016.
  67. Luykx, J. J., Laban, K. G., van den Heuvel, M. P., Boks, M. P., Mandl, R. C., et al. (2012) Region and state specific glutamate downregulation in major depressive disorder: a meta-analysis of (1)H-MRS findings, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **36**, 198-205, doi: 10.1016/j.neubiorev.2011.05.014.
  68. Knox, D., Perrine, S. A., George, S. A., Galloway, M. P., and Liberzon, I. (2010) Single prolonged stress decreases glutamate, glutamine, and creatine concentrations in the rat medial prefrontal cortex, *Neurosci. Lett.*, **480**, 16-20, doi: 10.1016/j.neulet.2010.05.052.
  69. Karolewicz, B., Szebeni, K., Gilmore, T., Maciag, D., Stockmeier, C. A., and Ordway, G. A. (2009) Elevated levels of NR2A and PSD-95 in the lateral amygdala in depression, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **12**, 143-153, doi: 10.1017/S1461145708008985.
  70. Gulyaeva, N. V. (2017) Interplay between brain BDNF and glutamatergic systems: a brief state of the evidence and association with the pathogenesis of depression, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 301-307, doi: 10.1134/S0006297917030087.
  71. Deschwanden, A., Karolewicz, B., Feyissa, A. M., Treyer, V., Ametamey, S. M., et al. (2011) Reduced metabotropic glutamate receptor 5 density in major depression determined by [(11)C]ABP688 PET and post-mortem study, *Am. J. Psychiatry*, **168**, 727-734, doi: 10.1176/appi.ajp.2011.09111607.
  72. Nishi, D., Hashimoto, K., Noguchi, H., Hamazaki, K., Hamazaki, T., and Matsuoka, Y. (2015) Glutamatergic system abnormalities in posttraumatic stress disorder, *Psychopharmacology*, **232**, 4261-4268, doi: 10.1007/s00213-015-4052-5.
  73. Meyerhoff, D. J., Mon, A., Metzler, T., and Neylan, T. C. (2014) Cortical gamma-aminobutyric acid and glutamate in posttraumatic stress disorder and their relationships to self-reported sleep quality, *Sleep*, **37**, 893-900, doi: 10.5665/sleep.3654.
  74. Rosso, I. M., Crowley, D. J., Silveri, M. M., Rauch, S. L., and Jensen, J. E. (2017) Hippocampus glutamate and n-acetyl aspartate markers of excitotoxic neuronal compromise in posttraumatic stress disorder, *Neuropsychopharmacology*, **42**, 1698-1705, doi: 10.1038/npp.2017.32.
  75. Ousdal, O. T., Milde, A. M., Craven, A. R., Eriland, L., Endestad, T., et al. (2019) Prefrontal glutamate levels predict altered amygdala-prefrontal connectivity in traumatized youths, *Psychol. Med.*, **49**, 1822-1830, doi: 10.1017/S0033291718002519.
  76. Holmes, S. E., Girenti, M. J., Davis, M. T., Pietrzak, R. H., DellaGioia, N., et al. (2017) Altered metabotropic

- glutamate receptor 5 markers in PTSD: *in vivo* and post-mortem evidence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 8390-8395, doi: 10.1073/pnas.1701749114.
77. Kirsch, I., Deacon, B. J., Huedo-Medina, T. B., Scoboria, A., Moore, T. J., and Johnson, B. T. (2008) Initial severity and antidepressant benefits: a meta-analysis of data submitted to the Food and Drug Administration, *PLoS Med.*, **5**, e45, doi: 10.1371/journal.pmed.0050045.
78. Cameron, L. P., Tombari, R. J., Lu, J., Pell, A. J., Hurley, Z. Q., et al. (2021) A non-hallucinogenic psychedelic analogue with therapeutic potential, *Nature*, **589**, 474-479, doi: 10.1038/s41586-020-3008-z.
79. Ravindran, L. N., and Stein, M. B. (2009) Pharmacotherapy of PTSD: premises, principles, and priorities, *Brain Res.*, **1293**, 24-39, doi: 10.1016/j.brainres.2009.03.037.
80. Torrens, M., Fonseca, F., Mateu, G., and Farré, M. (2005) Efficacy of antidepressants in substance use disorders with and without comorbid depression: a systematic review and meta-analysis, *Drug Alcohol Dependence*, **78**, 1-22, doi: 10.1016/j.drugalcdep.2004.09.004.
81. Raskind, M. A., Thompson, C., Petrie, E. C., Dobie, D. J., Rein, R. J., et al. (2002) Prazosin reduces nightmares in combat veterans with posttraumatic stress disorder, *J. Clin. Psychiatry*, **63**, 565-568, doi: 10.4088/jcp.v63n0705.

## COMPARATIVE ANALYSIS OF PATHOBIOCHEMICAL CHANGES IN MAJOR DEPRESSION AND POST-TRAUMATIC STRESS DISORDER

### Review

**K. N. Stupin, M. Y. Zenko, and E. A. Rybnikova\***

*Pavlov Institute of Physiology, Russian Academy of Sciences,  
199034 St.-Petersburg, Russia; E-mail: rybnikovaea@infran.ru*

Comparative analysis of available literature data on the pathogenetic neuroendocrine mechanisms of depression and post-traumatic stress disorder (PTSD) is provided in this review to identify their common features and differences. We discuss the multidirectional modifications of the activity of cortical and subcortical structures of the brain, levels of neurotransmitters and their receptors, and functions of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in depression and PTSD. The analysis shows that these disorders are examples of opposite failures in the system of adaptive stress response of the body to stressful psychotraumatic events. On this basis, it is concluded that the currently widespread use of similar approaches to treat these disorders is not justified, despite the significant similarity of their anxiety-depressive symptoms; development of differential therapeutic strategies is required.

**Keywords:** major depression, post-traumatic stress disorder, etiology, pathogenetic mechanisms, neurotransmitters, glucocorticoid hormones

УДК 612.014; 57.052; 57.053; 57.054

## СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РОЛИ СТРЕССА В ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКИХ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

### Обзор

© 2021 Л.Г. Хаспеков

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

Поступила в редакцию 05.03.2021

После доработки 26.04.2021

Принята в печать 26.04.2021

В обзоре обобщены данные литературы о клеточных и молекулярных механизмах, опосредующих влияние стресса на патогенез нейродегенеративных форм церебральной патологии (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и др.). Представлены современные сведения о роли стресса в гиперфосфорилировании тау-белка, агрегации бета-амилоида, гиперактивации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, участвующей в гиперпродукции факторов, способствующих усилению патогенетической роли стресса в нейродегенерации. Приведены данные об участии микроглии в медиации стрессового воздействия на патогенез нейродегенеративных заболеваний.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** стресс, нейродегенерация, деменция, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона.

**DOI:** 10.31857/S0320972521060117

### ВВЕДЕНИЕ

Гибель нервных клеток в ходе нейродегенерации приводит к тяжелым хроническим когнитивным и/или моторным расстройствам. Течение нейродегенеративных заболеваний усугубляется под влиянием перенесенных ранее организмом экстремальных стрессовых воздействий, среди которых могут быть неблагоприятные факторы окружающей среды, тяжелые соматические заболевания, травмы, отравления, сильные отрицательные эмоции и т.д. Исследование нейрональных цепей, опосредующих поведенческие и гормональные реакции на стресс, позволило выявить множество областей мозга, где связанная с заболеванием дисфункция вызывает нейродегенерацию, приводящую к развитию психоневрологических симптомов [1, 2]. К хроническим нейродегенеративным заболева-

ниям, патогенез которых значительно отягощается под влиянием стресса, признаваемым также одним из факторов риска, в первую очередь относят болезнь Альцгеймера (БА) и болезнь Паркинсона (БП). Другие распространенные дегенеративные заболевания нервной системы, в частности болезнь Гентингтона (БГ) и боковой амиотрофический склероз (БАС), судя по многочисленным данным литературы, изучены в этом отношении гораздо меньше.

Показано, что стресс, перенесенный в раннем возрасте (early-life stress), увеличивает риск развития деменции у взрослого. Кроме того, нарушения, ассоциируемые с посттравматическим стрессом, способствуют нейродегенерации, а хронический стресс приводит к повышению в цереброспинальной жидкости уровней биомаркеров неспецифического нейродегенеративного процесса – тау-белка и бета-амилоида 40 (A $\beta$  длиной 40 аминокислот) [3, 4].

Вероятно, в механизмы патогенетического влияния стресса на нейродегенерацию вовлечена иммунная система. Иммунные клетки мозга (в первую очередь микроглиальные) в ответ на стресс секретируют провоспалительные медиаторы, которые отрицательно влияют на морфофункциональные свойства нейронов, усиливая экспрессию провоспалительных генов, продукцию активных форм кислорода и перекисное окисление липидов [5]. Зависимость нейродеге-

Принятые сокращения: АКТГ – адренкортикотропный гормон; БА – болезнь Альцгеймера; БАС – боковой амиотрофический склероз; БГ – болезнь Гентингтона; БП – болезнь Паркинсона; ГГН-ось – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая ось; ГК – глюкокортикоиды; КС – кортикостероиды; A $\beta$  – бета-амилоид; BDNF – нейротрофический фактор головного мозга; CaMKII – кальций/кальмодулин-зависимая киназа II; CDK5 – циклин-зависимая киназа 5; CRH – кортикотропин-релизинг-гормон; CRHR – рецептор CRH; FOXO3 – транскрипционный фактор forkhead box O3; GSK3 $\beta$  – киназа гликогенсинтазы 3 $\beta$ .

нерации от стресса также может опосредоваться гиперфосфорилированием тау-белка, что подтверждается экспериментами с нокаутированием кодирующего его гена [6, 7].

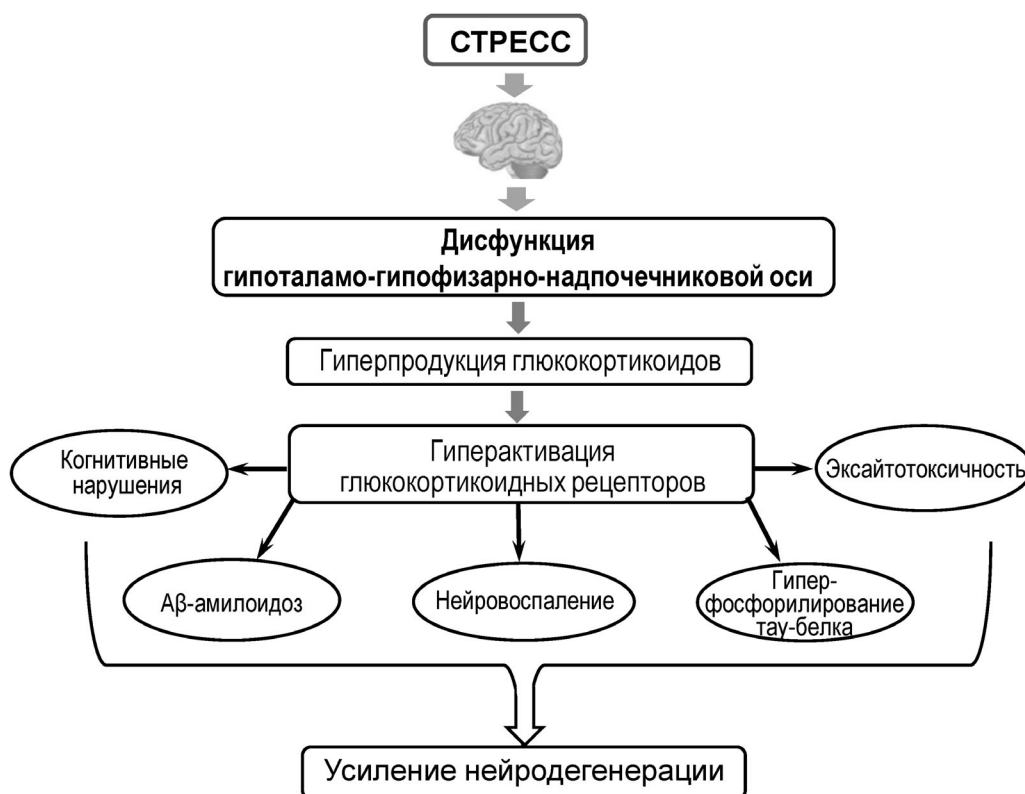
Тесная взаимосвязь между стрессом и нейродегенерацией обуславливается и рядом других факторов [4]. Так, усиленная продукция активных форм кислорода митохондриями при стрессе снижает их энергетический потенциал, отягощая нейродегенеративную патологию. В состоянии стресса индуцируется экспрессия транскрипционного фактора NR4A1 (Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 1), который модулирует энергетическую функцию митохондрий и регулирует нейрональную пластичность. В антенатальный и ранний постнатальный периоды стрессовые ситуации (внутриутробные инфекции, стресс матери, дефицит питания матери и/или ребенка) приводят к активации эпигенетических механизмов, негативно влияющих на структуру и функцию нервной ткани. Например, индуцированное перенесенным в раннем возрасте стрессом повреждение сигнального пути Fyn/NMDAR2B (Fyn

kinase and NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors) приводит к когнитивным нарушениям вследствие дисфункции ГАМКергических нейронов и снижения экспрессии белка реллина.

Под влиянием стресса активируется патогенез различных форм нейродегенеративной патологии головного мозга, как показано ниже.

### БОЛЕЗНЬ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Общепринятыми нейропатологическими маркерами болезни Альцгеймера являются внеклеточные скопления бета-амилоидного белка в ткани мозга и включения в нейронах гиперфосфорилированного тау-белка (далее – р-тау) в виде нейрофибриллярных клубков (рисунков). Хорошо известно, что в норме тау, принадлежащий к семейству белков, ассоциированных с микротрубочками, играет важную роль в сохранении структуры и целостности нервной ткани, стабилизируя нейритные микротрубочки и способствуя аксональному транспорту, синаптогенезу и росту нейритов [8].



Вовлечение стресса в патогенез болезни Альцгеймера (БА). Состояние стресса способствует дисрегуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси, что приводит к усилению продукции глюкокортикоидов с последующей гиперактивацией глюкокортикоидных рецепторов. Этот процесс сопровождается аккумуляцией Аβ, гиперфосфорилированием тау-белка, эксцитотоксичностью и нейровоспалением, что впоследствии приводит к когнитивным нарушениям и отягощению симптоматики БА. Пояснения в тексте

Однако в патофизиологических условиях может происходить гиперфосфорилирование и неправильный фолдинг тау с его агрегацией в нерастворимые структуры; термин «таупатия» используется для обозначения таких заболеваний (БА, болезнь Пика, кортикобазальная дегенерация и др.), для которых характерно патологическое накопление тау-белка в нейронах. Связываясь с микротрубочками, р-тау снижает растворимость и вызывает агрегацию последних в фибриллярные структуры, известные как парные спиральные филаменты, которые затем формируют внутри нейронов высокотоксичные филаментозные клубки, выявляемые при БА [8].

Показано, что различные виды стресса (холодовой, иммобилизационный, непредсказуемый, стресс голодания) сопровождаются значительным повышением в мозге экспериментальных животных уровня р-тау, что обычно обнаруживается при различных вариантах моделирования БА у крыс и мышей [9]. Важным фактором повышения уровня и накопления р-тау в мозге является активация стрессом каскада нейроэндокринных сигнальных путей, формирующего гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось (ГГН-ось, или НРА-axis). Основным признаком активации ГГН-оси под воздействием стресса является гиперсекреция глюкокортикоидов (ГК), которая оказывает нейротоксический эффект и усиливает аккумуляцию А $\beta$  у мышей с моделью БА [10, 11]. В то же время при хроническом стрессе у мышей с нокаутом гена, кодирующего тау-белок, нейроны гиппокампа и новой коры не атрофируются и, соответственно, не возникают когнитивные нарушения [7], что указывает на роль тау как патогенетического фактора стрессовых воздействий. У контрольных крыс введение ГК на фоне хронического непредсказуемого стресса повышало экспрессию эпитопов р-тау, характерных для БА, а потенцирование эффекта ГК усиливало формирование р-тау-подобных клубков в нейронах [12, 13].

Существование многочисленных регуляторных механизмов ГГН-оси позволяет предположить, что гиперфосфорилирование и аккумуляция р-тау, индуцируемые стрессом, опосредованы не только действием ГК. Действительно, у мышей с адреналэктомией состояние стресса также сопровождается повышением в мозге уровня р-тау. Следовательно, из факторов гормональной регуляции избыточного фосфорилирования тау при стрессе нельзя исключить еще одно звено ГГН-оси – паравентрикулярное ядро гипоталамуса, секреция которым кортикотропин-рилизинг-гормона (CRH) и вазопресина стимулирует высвобождение адренкорти-

котропного гормона (АКТГ) передней долей гипофиза и последующую активацию выработки ГК корой надпочечников [9]. Действие CRH опосредуется рецепторами CRHR1 и CRHR2, сопряженными с G-белком, причем у нокаутных по *CRHR1* мышей уровень р-тау снижен, а по *CRHR2* – повышен, что свидетельствует о преимущественном участии CRHR1 в патологическом формировании р-тау под влиянием стресса. Кроме того, у мышей с гиперэкспрессией CRH, обеспечивающей стабильную сигнализацию, опосредуемую ГК, также усиливается образование патологических форм р-тау [9].

Использование в экспериментах как острых, так и хронических стрессорных воздействий различной интенсивности показало усиление продукции А $\beta$  и его аккумуляцию в виде амилоидных бляшек у трансгенных мышей с моделью БА [14, 15]. У модельных мышей с двойным трансгеном (по предшественнику А $\beta$  и пресенилину-1, APP/PS1) хронический умеренный стресс усиливал повреждение нейронов и формирование сенильных бляшек [16, 17]. Даже кратковременный стресс в раннем возрасте у мышей с моделью БА влиял на аккумуляцию амилоида, вероятно, при участии нейровоспаления [18]. Повышение уровня интерстициального А $\beta$  можно было обнаружить уже в течение первого часа после индукции иммобилизационного стресса, а кратковременный стресс различной природы стимулировал формирование скоплений амилоида [14, 15, 19]. У мышей с моделью БА стрессовое состояние приводило к ускоренной утрате когнитивных функций [17, 20], при этом у молодых животных (возрастом до 1 года) стресс приводил к повышению содержания А $\beta$  в цереброспинальной жидкости и усилению его аккумуляции [14, 18].

Таким образом, индуцированная стрессом гиперактивация ГГН-оси сопровождается патологическим процессингом р-тау. При этом гиперфосфорилирование тау, наблюдаемое при БА, сопровождается нарушением регуляции протеостаза в нейронах, в норме поддерживаемого многочисленными механизмами и компонентами клеточного аппарата, которые отвечают за транскрипцию, синтез, модификацию, сортировку, транспортировку и локализацию белков. Нарушения протеостаза приводят, в конечном счете, к формированию токсических вариантов р-тау. Подобный дисбаланс происходит и при нейродегенеративных заболеваниях, для которых характерна патологическая агрегация белков с последующим необратимым повреждением нейронов.

В формировании р-тау задействовано более 80 сайтов фосфорилирования, осуществляемого



при участии многочисленных киназ, в том числе киназы гликогенсинтазы  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ), циклин-зависимой киназы 5 (CDK5), с-Jun N-терминальной киназы (JNK), кальций/кальмодулин-зависимой киназы II (CaMKII), АМР-активируемой протеинкиназы (АМРК), сАМР-зависимой протеинкиназы (РКА) и ряда других. Так, было обнаружено, что при холодовом стрессе в повышении уровня р-тау участвуют GSK3 $\beta$ , CDK5 и JNK. Обратный процесс, дефосфорилирование р-тау, опосредуется рядом фосфатаз, в частности протеинфосфатазой 2A, 2B, 1 и 5 (PP2A, PP2B, PP1 и PP5) [21].

В норме нейрональный тау-белок локализован в основном в аксонах, где он взаимодействует с микротрубочками и нейрофиламентами, участвуя в регуляции аксонального транспорта и нейротрофической сигнализации, а также поддержании цитоскелета. При БА р-тау выявляется в виде клубков в соме и дендритах нейронов, а также накапливается в синапсах, приводя к повреждению цитоскелета. Аналогичные изменения локализации тау, происходящие при хроническом стрессе, могут служить отягчающим фактором патогенеза БА [6, 8].

Реактивность микроглиальных клеток играет важную роль в патогенезе БА. Известно, что микроглия быстро реагирует на изменения гомеостаза мозга при стрессе, травме и других патологических состояниях организма [22, 23]. Клетки микроглии являются основными иммунными клетками мозга и наряду с регуляцией нейровоспалительных и нейродегенеративных процессов [24] участвуют в поддержании гомеостаза ЦНС, процессах обучения и запоминания, пластическом ремоделировании нейрональных цепей [25–28]. Для БА характерен так называемый реактивный микроглиоз, характеризующийся усиленной пролиферацией микроглиальных клеток в области скопления А $\beta$  [29].

При хроническом стрессе реактивность микроглии возрастает, опосредуя реакцию мозга на постоянное стрессорное воздействие [30]. Результаты экспериментальных исследований показывают, что микроглия играет важную роль в медиации влияния хронического стресса на манифестацию и прогрессирование БА [31]. У трансгенных мышей в отсутствие взаимодействия нейронов с микроглией, опосредуемого в норме хемокином Cx3cl1 (фракталкином) и нарушенного нокаутом гена, кодирующего его рецептор Cx3cr1, хронический стресс не влияет на морфологию микроглиальных клеток и не вызывает признаков депрессивных расстройств [32]. Сходные данные о повышенной устойчивости к стрессу у мышей с нокаутом Cx3cr1 по-

лучены в результате исследований различных форм хронического стресса [33–35]. У трансгенных мышей линии Tg2576 с моделью БА под влиянием хронического стресса ускорялось возрастное накопление А $\beta$  в мозге, сопровождаемое торможением нейрогенеза в гиппокампе и нарушением контекстуальной памяти [36]. Показано, что стрессорные воздействия различной природы ингибировали экспрессию нейротрофинов, в частности нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), в нейронах гиппокампа экспериментальных животных [37, 38]. Снижение уровня BDNF, коррелирующее с тяжестью симптоматики БА, обнаруживалось в гиппокампе и височной коре пациентов на доклинической и клинической стадиях заболевания [39, 40]. Следовательно, нарушения сигнализации BDNF и, вероятно, ряда других нейротрофинов могут быть медиатором патогенетических эффектов хронического стресса и влиять на течение БА.

Существуют доказательства того, что хронический стресс может ускорять старение, которое является одним из основных факторов риска развития БА и характеризуется снижением способности адекватно реагировать на стресс, причем в процессе старения экспрессия глюкокортикоидных рецепторов ослабевает, а появление при этом свободного кортизола оказывает нейротоксический эффект [41]. Кроме того, старение может способствовать воспалительному процессу, включающему активацию микроглии с участием рецепторного механизма, который опосредует передачу сигналов кортизола [41] и при старении страдает, что приводит к изменениям циркадного ритма с нарушениями сна, сопровождающимися усилением секреции кортизола [42].

Как уже говорилось выше, у мышей с БА хронический стресс приводит к ускоренному развитию заболевания, в частности усиливает отложение внеклеточных бета-амилоидных бляшек и внутриклеточное гиперфосфорилирование тау-белка [43], что, по крайней мере, частично обусловлено гиперсекрецией кортикостероидов. Еще одним механизмом стресс-индуцированного отягощения симптомов БА, способствующим накоплению А $\beta$  и гиперфосфорилированию тау, может быть усиленная секреция гипоталамического кортикотропин-рилизинг-гормона [19].

Принимая во внимание результаты многочисленных исследований в различных лабораториях и на разных экспериментальных моделях БА, можно с большой долей уверенности утверждать, что практически любой тип стресса ускоряет патогенез заболевания, способствуя внекле-

точной аккумуляции А $\beta$  и формированию клубков р-тау [19]. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что стресс является важным фактором ускорения развития БА и у человека.

Существуют указания на то, что тяжелые возраст-зависимые заболевания, такие как диабет и метаболический синдром, сами по себе могут индуцировать стрессовое состояние у человека, приводя к повышению риска развития БА [44, 45]. Кроме того, связь между депрессивными симптомами и деменцией у пожилых людей может быть в первую очередь обусловлена как общими причинами, так и симптомами, отражающими особенности доклинической фазы деменции [46].

Одной из структур головного мозга, наиболее повреждаемой при БА, особенно под влиянием стресса, является гиппокамп [11]. В нем активно экспрессируются глюкокортикоидные и минералокортикоидные рецепторы, баланс которых обеспечивает правильное функционирование гиппокампа. Стресс способен нарушить баланс между рецепторами этих типов и привести к уменьшению объема гиппокампа [47, 48]. Динамическое МРТ-исследование характера атрофии полей гиппокампа крыс под воздействием физических и психологических стрессоров показало, что в обоих случаях атрофия сначала идентифицируется в СА1, тогда как СА3 и зубчатая извилина затрагиваются позднее, хотя именно поле СА3 повреждается наиболее интенсивно. С устранением стресса состояние аммонова рога постепенно возвращается к норме, однако атрофия зубчатой извилины продолжает развиваться [49, 50].

Известно, что длительное воздействие повышенных уровней кортикостероидов приводит к изменению морфологии дендритов и уменьшению объема гиппокампа [51–53]. У старых крыс психологический стресс, индуцированный длительной социальной изоляцией, одновременно с нарушением пространственной памяти привел к повышению уровня плазматического кортикостерона, а также сокращению объема краевого слоя и плотности шипиков в поле СА1 [54]. Сходные с указанными изменения были обнаружены и в гиппокампе пожилых людей, у которых при многолетнем и стабильно высоком уровне кортизола на фоне хронического стресса наблюдалось уменьшение объема полей СА2, СА3, СА4 и зубчатой извилины [55]. Полагают, что индуцированная стрессом атрофия зубчатой извилины, в которой на протяжении всей жизни у многих видов позвоночных, включая человека, сохраняется устойчивый нейрогенез, является важным фактором развития возрастных когнитивных нарушений и деменции [56].

Сказанное выше позволяет предположить наличие прямой корреляции между стресс-индуцированным повышением уровня глюкокортикоидов в кровяном русле и прогрессирующими когнитивными нарушениями. Высокое содержание кортизола в слюне пожилых пациентов, отражающее уровень биологически активного свободного кортизола в сыворотке крови, может служить маркером возрастных когнитивных нарушений. В недавней работе Но et al. [57] такое повышение уровня кортизола в крови у пациентов с умеренными когнитивными нарушениями было экспериментально подтверждено.

Ранее было показано, что ассоциированная с БА деменция на ранней стадии ассоциируется с повышением уровня кортикостероидов (КС) в крови и нервно-психическими расстройствами, которые обусловлены тревожным состоянием. Впервые увеличение уровня КС в сосудистом русле было обнаружено у пациентов с умеренными когнитивными нарушениями [58, 59]. Позднее оказалось, что дальнейшее повышение уровня КС прямо коррелирует с ускорением прогрессирования деменции [60, 61]. С использованием базы данных ADNI (Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative) при анализе МРТ головного мозга пациентов на самых ранних стадиях деменции и через 2 года было показано, что депрессивная симптоматика ассоциирована с ускорением снижения плотности ткани мозга и повышением вероятности трансформации умеренных когнитивных нарушений в деменцию [62, 63].

## БОЛЕЗНЬ ПАРКИНСОНА

Локомоторные нарушения у пациентов с болезнью Паркинсона (БП) сочетаются с эмоциональным дистрессом и снижением способности к ежедневной нормальной жизнедеятельности [64]. Кроме того, для наиболее подверженных стрессу пациентов характерно наличие немоторных симптомов и снижение качества жизни [65].

В целом диагнозу БП *de novo* часто предшествует психологический стресс, а также изменения в ГГН-оси, оцениваемые по уровням кортизола и АКТГ в крови [66]. По результатам обширного популяционного исследования, посттравматический стресс представляется серьезным фактором риска БП [67]. Кроме того, эмоциональные стимулы, вызывающие стресс, могут способствовать усугублению двигательных симптомов при БП [68].

Полагают, что белок RTP801 играет важную роль в процессах, опосредующих влияние стрес-

са на патогенез БП. Показано, что после стрессорного воздействия содержание RTP801 в дофаминергических нейронах черной субстанции возрастает, при этом ингибируется аутофагия и усиливается аккумуляция  $\alpha$ -синуклеина [69].

Стресс при БП может действовать как «акселератор» заболевания. Действительно, у самцов мышей с моделью БП в условиях хронического стресса происходило усиленное накопление  $\alpha$ -синуклеина, сопровождавшееся двигательными нарушениями [70]. Однако молекулярные механизмы, опосредующие гендерные различия этого эффекта, до сих пор не выяснены.

В одной из последних работ, основанной на мета-анализе ряда публикаций, обнаружена ассоциация между подверженностью стрессу в раннем возрасте и развитием депрессии и БП [71]. Показано, что стресс этого типа может способствовать развитию депрессии, а пациенты с депрессией подвергаются риску развития БП в более позднем возрасте. Подчеркивается, что депрессия является распространенным моторным симптомом, предшествующим двигательным нарушениям при БП. Стимуляция областей, прилегающих к черной субстанции, а также применение дофаминовых агонистов может облегчить течение депрессии. Авторы заключают, что, поскольку БП вызывает истощение дофаминергических нейронов черной субстанции, депрессия может быть частью патофизиологического процесса, приводящего к БП. Вполне вероятно, что мезокортикальные и мезолимбические дофаминергические пути, лежащие в основе эмоций и когнитивных функций, также могут играть ключевую роль в депрессии, ассоциированной с БП. Отмечается положительный терапевтический эффект антидепрессанта флувоксамина (из группы селективных ингибиторов обратного захвата серотонина) в экспериментах на животных с моделью БП в сочетании с депрессивно-подобным поведением [71].

В совсем недавнем детальном исследовании, выполненном на крысах с моделью БП, нокаутных по гену *Pink1*, обнаружено, что хронический психологический дистресс индуцирует у них моторные симптомы, подобные наблюдаемым при БП у человека, и способствует развитию нейродегенеративной патологии [72]. У молодых крыс, подвергнутых психологическому дистрессу (реакция на хищника), проводили анализ биоэнергетического профиля головного мозга (окислительное фосфорилирование и гликолиз), поведения и двигательной функции, оценку экспрессии антиоксидантных ферментов и BDNF, а также состояния митохондрий. Результаты показали снижение митохондриаль-

ного дыхания и гликолиза до 50%, снижение уровня антиоксидантных белков, а также содержания митохондрий и BDNF в префронтальной коре крыс как дикого типа, так и нокаутных. Кроме того, психологический дистресс заметно индуцировал тревогу и появление паркинсонических симптомов у крыс дикого типа и ускорял манифестацию симптомов БП у нокаутных животных.

Получены новые данные, раскрывающие роль микроглии и индуцируемого стрессом воспаления в патогенезе БП [73] и описывающие роль инфламмосомы NLRP3, полипротеинового олигомерного комплекса, отвечающего за распознавание стрессовых сигналов и реализацию воспалительного ответа [74]. Так, в поведенческих экспериментах и морфохимических исследованиях головного мозга крыс было описано нарастание нарушений в поведении, а также активация микроглии и инфламмосомы NLRP3 у крыс с индуцированным липополисахаридом синдромом БП через 2 недели после хронического непредсказуемого умеренного стресса. В эти же сроки после стрессового воздействия в сыворотке крови этих животных повышался уровень интерлейкина-1 $\beta$ , интерлейкина-6 и фактора некроза опухоли  $\alpha$ , а в черной субстанции усиливалась экспрессия NLRP3, Asc (адаптерного белка с доменом активации каспазы) и каспазы-1, сопровождавшаяся повреждением дофаминергических нейронов. Таким образом, показано, что предварительное воздействие стресса усиливает активацию микроглии и повреждение дофаминергических нейронов, что, вероятно, опосредуется ускорением воспалительного ответа и активацией инфламмосомы NLRP3. Эти данные значительно расширили сформулированные в более ранних работах представления о патогенетической роли стресса в активации микроглии и индуцируемого ею нейровоспаления при БП [70, 75, 76].

## ДРУГИЕ ФОРМЫ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОЙ ЦЕРЕБРАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ

**Болезнь Гентингтона.** У мышей R6/1 HD с моделью болезнью Гентингтона (БГ), так же как при БА и БП, изменяется активность ГН-оси, что указывает на вовлечение кортизола в патогенез БГ [77]. Интересно отметить, что степень отягощения хроническим стрессом симптоматики БГ, такой как локомоторная активность и координация, обонятельная чувствительность, была связана с полом животного [78]. При стрессе двигательная активность и координация усиливались у самцов, но не у самок, независи-

мо от генотипа, тогда как обонятельная чувствительность нарушалась у самок мышей R6/1 HD, но не у дикого типа. Обонятельная чувствительность у самцов снижалась — как у мышей линии R6/1 HD, так и у дикого типа.

Кроме того, выявлен общий сигнальный путь, характерный как для стресса, так и для БГ, в котором задействован трансформирующий фактор роста  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) в сочетании с транскрипционным фактором forkhead box O3 (FOXO3) [79].

**Боковой амиотрофический склероз.** О влиянии стресса на патогенез бокового амиотрофического склероза (БАС) сведений в литературе очень мало. Так, в одной из работ было показано, что индивиды с высокой устойчивостью к стрессу были менее подвержены риску развития БАС в возрасте до 55 лет [80]. Однако результаты другого исследования свидетельствуют о том, что стресс (в данном случае, профессиональный) не является фактором риска развития этого заболевания, поскольку у пациентов с БАС и в контрольной группе наблюдался сходный стрессовый фон [81]. Не выявлено никакой связи между когнитивными нарушениями и стрессом среди пациентов с БАС [82]. Противоречивые результаты этих исследований могут отчасти объясняться применением различных нейropsychологических и нейропсихиатрических подходов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Стресс вызывает глубокие изменения в работе мозга от морфофункциональной реорганизации нервной ткани до нарушения экспрессии синаптических белков и является одним из

мощных критических факторов, влияющих на патогенез нейродегенеративных заболеваний. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что патогенетические эффекты стресса во многом опосредуются активацией ГН-оси с последующей цитотоксической гиперпродукцией ГК, которые способны воздействовать на множество субклеточных механизмов, таким образом, приводить к нарушению протеостаза, а также структуры и функции нейронов. Этот процесс может усугубляться мутациями в ключевых генах и старением, которое само по себе также является важным фактором риска нейродегенеративных заболеваний.

Следует, однако, отметить, что специфические клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе стресс-индуцированной агрегации белков, остаются недостаточно изученными. Поэтому дальнейшие исследования должны быть сосредоточены на детальном изучении этих механизмов при особом внимании к стрессовым ситуациям в ранний период жизни, пагубные последствия которых могут проявляться и во взрослом возрасте вплоть до самой старости. Кроме того, при разработке эффективной терапии нейродегенеративной патологии следует учитывать стресс как важный фактор риска развития заболевания.

**Финансирование.** Работа не была финансирована какими-либо фондами или проектами.

**Конфликт интересов.** Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kolanowski, A., Boltz, M., Galik, E., Gitlin, L. N., Kales, H. C., et al. (2017) Determinants of behavioral and psychological symptoms of dementia: a scoping review of the evidence, *Nurs. Outlook*, **65**, 515-529, doi: 10.1016/j.outlook.2017.06.006.
2. Ross, J. A., Gliabus, G., and Van Bockstaele, E. J. (2017) Stress induced neural reorganization: a conceptual framework linking depression and Alzheimer's disease, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **85**, 136-151, doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.08.004.
3. Donley, G. A. R., Lönnroos, E., Tuomainen, T. P., and Kauhanen, J. (2018) Association of childhood stress with late-life dementia and Alzheimer's disease: the KIHU study, *Eur. J. Public Health*, **28**, 1069-1073, doi: 10.1093/eurpub/cky134.
4. Peña-Bautista, C., Casas-Fernández, E., Vento, M., Baquero, M., and Cháfer-Pericás, C. (2020) Stress and neurodegeneration. *Clin. Chim. Acta*, **503**, 163-168, doi: 10.1016/j.cca.2020.01.019.
5. Liu, Y. Z., Wang, Y. X., and Jiang, C. L. (2017) Inflammation: the common pathway of stress-related diseases, *Front. Hum. Neurosci.*, **11**, 316, doi: 10.3389/fnhum.2017.00316.
6. Lopes, S., Vaz-Silva, J., Pinto, V., Dalla, C., Kokras, N., et al. (2016) Tau protein is essential for stress-induced brain pathology, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E3755-E3763, doi: 10.1073/pnas.1600953113.
7. Lopes, S., Teplytska, L., Vaz-Silva, J., Dioli, C., Trindade, R., et al. (2017). Tau deletion prevents stress-induced dendritic atrophy in prefrontal cortex: role of synaptic mitochondria, *Cerebr. Cortex*, **27**, 2580-2591.
8. Arendt, T., Stieler, J. T., and Holzer, M. (2016) Tau and tauopathies, *Brain Res. Bull.*, **126**, 238-292, doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.08.018.
9. Sierra-Fonseca, J. A., and Gosselink, K. L. (2018) Tauopathy and neurodegeneration: a role for stress, *Neurobiol. Stress*, **9**, 105-112, doi: 10.1016/j.ynstr.2018.08.009.

10. Stephens, M. A., and Wand, G. (2012) Stress and the HPA axis: role of glucocorticoids in alcohol dependence, *Alcohol. Res.*, **34**, 468-483.
11. Gulyaeva, N. V. (2019) Biochemical mechanisms and translational relevance of hippocampal vulnerability to distant focal brain injury: the price of stress response, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1306-1328, doi: 10.1134/S0006297919110087.
12. Sotiropoulos, I., and Sousa, N. (2016) Tau as the converging protein between chronic stress and Alzheimer's disease synaptic pathology, *Neurodegener. Dis.*, **16**, 22-25, doi: 10.1159/000440844.
13. Yi, J. H., Brown, C., Whitehead, G., Piers, T., Lee, Y. S., et al. (2017) Glucocorticoids activate a synapse weakening pathway culminating in tau phosphorylation in the hippocampus, *Pharmacol. Res.*, **121**, 42-51, doi: 10.1016/j.phrs.2017.04.015.
14. Lesuis, S. L., Maurin, H., Borghgraef, P., Lucassen, P. J., Van Leuven, F., and Krugers, H. J. (2016) Positive and negative early life experiences differentially modulate long term survival and amyloid protein levels in a mouse model of Alzheimer's disease, *Oncotarget*, **7**, 39118-39135, doi: 10.18632/oncotarget.9776.
15. Justice, N. J., Huang, L., Tian, J. B., Cole, A., Pruski, M., et al. (2015) Posttraumatic stress disorder-like induction elevates beta-amyloid levels, which directly activates corticotropin-releasing factor neurons to exacerbate stress responses, *J. Neurosci.*, **35**, 2612-2623, doi: 10.1523/JNEUROSCI.3333-14.2015.
16. Cuadrado-Tejedor, M., and García-Osta, A. (2016) Chronic mild stress assay leading to early onset and propagation of Alzheimer's disease phenotype in mouse models, *Methods Mol. Biol.*, **1303**, 241-246, doi: 10.1007/978-1-4939-2627-5\_14.
17. Han, B., Yu, L., Geng, Y., Shen, L., Wang, H., et al. (2016) Chronic stress aggravates cognitive impairment and suppresses insulin associated signaling pathway in APP/PS1 mice, *J. Alzheimer's Dis.*, **53**, 1539-1552, doi: 10.3233/JAD-160189.
18. Hoeijmakers, L., Ruigrok, S. R., Amelianchik, A., Ivan, D., van Dam, A. M., et al. (2017) Early-life stress lastingly alters the neuroinflammatory response to amyloid pathology in an Alzheimer's disease mouse model, *Brain Behav. Immun.*, **63**, 160-175, doi: 10.1016/j.bbi.2016.12.023.
19. Justice, N. J. (2018) The relationship between stress and Alzheimer's disease, *Neurobiol. Stress*, **8**, 127-133, doi: 10.1016/j.yjnstr.2018.04.002.
20. Han, B., Wang, J. H., Geng, Y., Shen, L., Wang, H. L., et al. (2017) Chronic stress contributes to cognitive dysfunction and hippocampal metabolic abnormalities in APP/PS1 mice, *Cell. Physiol. Biochem.*, **41**, 1766-1776, doi: 10.1159/000471869.
21. Mietelska-Porowska, A., Wasik, U., Goras, M., Filipek, A., and Niewiadomska, G. (2014) Tau protein modifications and interactions: their role in function and dysfunction, *Int. J. Mol. Sci.*, **15**, 4671-4713, doi: 10.3390/ijms15034671.
22. Matcovitch-Natan, O., Winter, D. R., Giladi, A., Vargav, S., Spinrad, A., et al. (2016) Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis, *Science*, **353**, aad8670, doi: 10.1126/science.aad8670.
23. Tian, L., Hui, C. W., Bisht, K., Tan, Y., Sharma, K., et al. (2017) Microglia under psychosocial stressors along the aging trajectory: consequences on neuronal circuits, behavior, and brain diseases, *Prog. Neuropsychopharmacol., Biol. Psychiatry*, **79 (Pt. A)**, 27-39, doi: 10.1016/j.pnpbp.2017.01.007.
24. Cartier, N., Lewis, C.-A., Zhang, R., and Rossi, F. M. V. (2014) The role of microglia in human disease: therapeutic tool or target? *Acta Neuropathol.*, **128**, 363-380, doi: 10.1007/s00401-014-1330-y.
25. Derecki, N. C., Katzmarski, N., Kipnis, J., and Meyer-Luehmann, M. (2014) Microglia as a critical player in both developmental and late-life CNS pathologies, *Acta Neuropathol.*, **128**, 333-345, doi: 10.1007/s00401-014-1321-z.
26. Sipe, G. O., Lowery, R. L., Tremblay, M.-È., Kelly, E. A., Lamantia, C. E., and Majewska, A. K. (2016) Microglial P2Y12 is necessary for synaptic plasticity in mouse visual cortex, *Nat. Commun.*, **7**, 10905, doi: 10.1038/ncomms10905.
27. Ransohoff, R. M., and El Khoury, J. (2015) Microglia in health and disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **8**, a020560, doi: 10.1101/cshperspect.a020560.
28. Tay, T. L., Savage, J. C., Hui, C. W., Bisht, K., and Tremblay, M.-È. (2017) Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition, *J. Physiol.*, **595**, 1929-1945, doi: 10.1113/JP272134.
29. Chun, H., Marriott, I., Lee, C. J., Cho, H. (2018) Elucidating the interactive roles of glia in Alzheimer's disease using established and newly developed experimental models. *Front. Neurol.*, **26**, 797, doi: 10.3389/fneur.2018.00797.
30. Santos, L. E., Beckman, D., and Ferreira, S. T. (2016) Microglial dysfunction connects depression and Alzheimer's disease, *Brain Behav. Immun.*, **55**, 151-165, doi: 10.1016/j.bbi.2015.11.011.
31. Piirainen, S., Youssef, A., Song, C., Kalueff, A. V., Landreth, G. E., et al. (2017) Psychosocial stress on neuroinflammation and cognitive dysfunctions in Alzheimer's disease: the emerging role for microglia? *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **77**, 148-164, doi: 10.1016/j.neubiorev.2017.01.046.
32. Milior, G., Lecours, C., Samson, L., Bisht, K., Poggini, S., et al. (2016) Fractalkine receptor deficiency impairs microglial and neuronal responsiveness to chronic stress, *Brain Behav. Immun.*, **55**, 114-125, doi: 10.1016/j.bbi.2015.07.024.
33. Hellwig, S., Brioschi, S., Dieni, S., Frings, L., Masuch, A., et al. (2016) Altered microglia morphology and higher resilience to stress-induced depression-like behavior in CX3CR1-deficient mice, *Brain Behav. Immun.*, **55**, 126-137, doi: 10.1016/j.bbi.2015.11.008.
34. Rimmerman, N., Schottlender, N., Reshef, R., Dan-Goor, N., and Yirmiya, R. (2017) The hippocampal transcriptomic signature of stress resilience in mice with microglial fractalkine receptor (CX3CR1) deficiency, *Brain Behav. Immun.*, **61**, 184-196, doi: 10.1016/j.bbi.2016.11.023.
35. Winkler, Z., Kuti, D., Ferenczi, S., Gulyás, K., Polyák, Á., and Kovács, K. J. (2017) Impaired microglia fractalkine signaling affects stress reaction and coping style in mice, *Behav. Brain Res.*, **334**, 119-128, doi: 10.1016/j.bbr.2017.07.023.
36. Dong, H., Goico, B., Martin, M., Csernansky, C. A., Bertchume, A., and Csernansky, J. G. (2004) Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APPsw (Tg2576) mutant mice by isolation stress, *Neuroscience*, **127**, 601-609, doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.05.040.
37. Chiba, S., Numakawa, T., Ninomiya, M., Richards, M. C., Wakabayashi, C., and Kunugi, H. (2012) Chronic restraint stress causes anxiety- and depression-like behaviors, downregulates glucocorticoid receptor expression, and attenuates glutamate release induced by brain-derived neurotrophic factor in the prefrontal cortex, *Prog.*

- Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **39**, 112-119, doi: 10.1016/j.pnpb.2012.05.018.
38. Roth, T. L., Zoladz, P. R., Sweatt, J. D., and Diamond, D. M. (2011) Epigenetic modification of hippocampal BDNF DNA in adult rats in an animal model of post-traumatic stress disorder, *J. Psychiatr. Res.*, **45**, 919-926, doi: 10.1016/j.jpsychires.2011.01.013.
  39. Michalski, B., and Fahnstock, M. (2003) Pro-brain-derived neurotrophic factor is decreased in parietal cortex in Alzheimer's disease, *Mol. Brain Res.*, **111**, 148-154, doi: 10.1016/S0169-328X(03)00003-2.
  40. Peng, S., Wu, J., Mufson, E. J., and Fahnstock, M. (2005) Precursor form of brain-derived neurotrophic factor and mature brain-derived neurotrophic factor are decreased in the pre-clinical stages of Alzheimer's disease, *J. Neurochem.*, **93**, 1412-1421, doi: 10.1111/j.1471-4159.2005.03135.x.
  41. Fonken, L. K., Frank, M. G., Gaudet, A. D., and Maier, S. F. (2018) Stress and aging act through common mechanisms to elicit neuroinflammatory priming, *Brain. Behav. Immun.*, **73**, 133-148, doi: 10.1016/j.bbi.2018.07.012.
  42. Schouten, M., Bielefeld, P., Garcia-Corzo, L., Passchier, E. M. J., Gradari, S., et al. (2019) Circadian glucocorticoid oscillations preserve a population of adult hippocampal neural stem cells in the aging brain, *Mol. Psychiatry*, **25**, 1382-1405, doi: 10.1038/s41380-019-0440-2.
  43. Kvetnansky, R., Novak, P., Vargovic, P., Lejavova, K., Horvathova, L., Ondicova, K., et al. (2016) Exaggerated phosphorylation of brain tau protein in CRH KO mice exposed to repeated immobilization stress, *Stress*, **19**, 395-405, doi: 10.1080/10253890.2016.1183119
  44. Huang, C.-C., Chung, C.-M., Leu, H.-B., Lin, L.-Y., Chiu, C.-C., et al. (2014) Diabetes mellitus and the risk of Alzheimer's disease: a nationwide population-based study, *PLoS One*, **9**, e87095, doi: 10.1371/journal.pone.0087095.
  45. Rojas-Gutierrez, E., Muñoz-Arenas, G., Treviño, S., Espinosa, B., Chavez, R., et al. (2017) Alzheimer's disease and metabolic syndrome: a link from oxidative stress and inflammation to neurodegeneration, *Synapse*, **71**, e21990, doi: 10.1002/syn.21990.
  46. Singh-Manoux, A., Dugravot, A., Fournier, A., Abell, J., Ebmeier, K., et al. (2017) Trajectories of depressive symptoms before diagnosis of dementia: a 28-year follow-up study, *JAMA Psychiatry*, **74**, 712-718, doi: 10.1001/jamapsychiatry.2017.0660.
  47. Rogalska, J. (2010) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in hippocampus: their impact on neurons survival and behavioral impairment after neonatal brain injury, *Vitam Horm.*, **82**, 391-419, doi: 10.1016/S0083-6729(10)82020-5.
  48. Yau, J. L. W., Noble, J., and Seckl, J. R. (2011) 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 deficiency prevents memory deficits with aging by switching from glucocorticoid receptor to mineralocorticoid receptor-mediated cognitive control, *J. Neurosci.*, **31**, 4188-4193, doi: 10.1523/JNEUROSCI.6145-10.2011.
  49. Li, Y., Qin, J., Yan, J., Zhang, N., Xu, Y., et al. (2019) Differences of physical vs. psychological stress: evidences from glucocorticoid receptor expression, hippocampal subfields injury, and behavioral abnormalities, *Brain Imaging Behav.*, **13**, 1780-1788, doi: 10.1007/s11682-018-9956-3.
  50. McEwen, B. S. (1997) Possible mechanisms for atrophy of the human hippocampus, *Mol. Psychiatry*, **2**, 255-262, doi: 10.1038/sj.mp.4000254.
  51. Sousa, N., Madeira, M. D., and Paula-Barbosa, M. M. (1998) Effects of corticosterone treatment and rehabilitation on the hippocampal formation of neonatal and adult rats. An unbiased stereological study, *Brain Res.*, **794**, 199-210, doi: 10.1016/S0006-8993(98) 00218-2.
  52. Sousa, N., Lukoyanov, N. V., Madeira, M. D., Almeida, O. F. X., and Paula-Barbosa, M. M. (2000) Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement, *Neuroscience*, **97**, 253-266, doi: 10.1016/S0306-4522(00)00050-6.
  53. Woolley, C. S., Gould, E., and McEwen, B. S. (1990) Exposure to excess glucocorticoids alters dendritic morphology of adult hippocampal pyramidal neurons, *Brain Res.*, **531**, 225-231, doi: 10.1016/0006-8993(90)90778-A.
  54. Pereda-Pérez, I., Valencia, A., Baliyan, S., Núñez, A., Sanz-García, A., et al. (2019) Systemic administration of a fibroblast growth factor receptor 1 agonist rescues the cognitive deficit in aged socially isolated rats, *Neurobiol. Aging*, **78**, 155-165, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2019.02.011.
  55. Zimmerman, M. E., Ezzati, A., Katz, M. J., Lipton, M. L., Brickman, A. M., et al. (2016) Perceived stress is differentially related to hippocampal subfield volumes among older adults, *PLoS One*, **11**, 154530, doi: 10.1371/journal.pone.0154530.
  56. Moreno-Jiménez, E. P., Flor-García, M., Terreros-Roncal, J., Rábano, A., Cafini, F., et al. (2019) Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease, *Nat. Med.*, **25**, 554-560, doi: 10.1038/s41591-019-0375-9.
  57. Ho, R. T. H., Fong, T. C. T., Yau, J. C. Y., Chan, W. C., Kwan, J. S. K., et al. (2020) Diurnal cortisol slope mediates the association between affect and memory retrieval in older adults with mild cognitive impairment: a pathanalytical study, *Front. Aging Neurosci.*, **12** 35, doi: 10.3389/fnagi.2020.00035.
  58. Davis, K. L., Davis, B. M., Greenwald, B. S., Mohs, R. C., Mathe, et al. (1986) Cortisol and Alzheimer's disease, I: basal studies, *Am. J. Psychiatr.*, **143**, 300-305, doi: 10.1176/ajp.143.3.300.
  59. Hartmann, A., Veldhuis, J. D., Deuschle, M., Standhardt, H., and Heuser, I. (1997) Twenty-four hour cortisol release profiles in patients with Alzheimer's and Parkinson's disease compared to normal controls: ultradian secretory pulsatility and diurnal variation, *Neurobiol. Aging*, **18**, 285-289, doi: 10.1016/S0197-4580(97)80309-0.
  60. Lupien, S. J., de Leon, M., de Santi, S., Convit, A., Tarshish, C., et al. (1998) Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits, *Nat. Neurosci.*, **1**, 69-73, doi: 10.1038/271.
  61. Csernansky, J. G., Dong, H., Fagan, A. M., Wang, L., Xiong, C., et al. (2006) Plasma cortisol and progression of dementia in subjects with Alzheimer type dementia, *Am. J. Psychiatry*, **163**, 2164-2169, doi: 10.1176/ajp.2006.163.12.2164.
  62. Lebedeva, A. K., Westman, E., Borza, T., Beyer, M. K., Engedal, K., et al. (2017) MRI-Based classification models in prediction of mild cognitive impairment and dementia in late-life depression, *Front. Aging Neurosci.*, **9**, 13, doi: 10.3389/fnagi.2017.00013.
  63. Mah, L., Binns, M. A., and Steffens, D. C. (2015) Anxiety symptoms in amnesic mild cognitive impairment are associated with medial temporal atrophy and predict conversion to Alzheimer's disease, *Am. J. Geriatr. Psychiatry*, **23**, 466-476, doi: 10.1016/j.jagp.2014.10.005.
  64. Starkstein, S., Dragovic, M., Brockman, S., Wilson, M., Bruno, V., and Merello, M. (2015) The impact of emotional distress on motor blocks and festination in Parkinson's disease, *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.*, **27**, 121-126, doi: 10.1176/appi.neuropsych.13030053.
  65. Kim, S. R., Kim, J. Y., Kim, H. K., Lim, K. E., Kim, M. S., and Chung, S. J. (2017) Association among type D personality, non-motor symptoms, and quality of life in

- Parkinson's disease: a cross-sectional study, *Geriatr Nurs.*, **38**, 431-436, doi: 10.1016/j.gerinurse.2017.02.006.
66. Ibrahimagic, O. C., Jakubovic, A. C., Smajlovic, D., Dostovic, Z., Kunic, S., Iljazovic, A. (2016) Psychological stress and changes of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in patients with "De Novo" Parkinson's disease, *Med. Arch.*, **70**, 445-448, doi: 10.5455/medarh.016.70.445-448.
  67. Chan, Y. E., Bai, Y. M., Hsu, J. W., Huang, K. L., Su, T. P., et al. (2017) Post-traumatic stress disorder and risk of Parkinson's disease: a nationwide longitudinal study, *Am. J. Geriatr. Psychiatry*, **25**, 917-923, doi: 10.1016/j.jagp.2017.03.012.
  68. Blakemore, R. L., MacAskill, M. R., Shoorangiz, R., and Anderson, T. J. (2018) Stress-evoking emotional stimuli exaggerate deficits in motor function in Parkinson's disease, *Neuropsychologia*, **112**, 66-76, doi: 10.1016/j.neuropsychologia.2018.03.006.
  69. Zhang, Z., Chu, S. F., Wang, S. S., Jiang, Y. N., Gao, Y., et al. (2018) RTP801 is a critical factor in the neurodegeneration process of A53T  $\alpha$ -synuclein in a mouse model of Parkinson's disease under chronic restraint stress, *Br. J. Pharmacol.*, **175**, 590-605, doi: 10.1111/bph.14091.
  70. Wu, Q., Yang, X., Zhang, Y., Zhang, L., and Feng, L. (2016) Chronic mild stress accelerates the progression of Parkinson's disease in A53T  $\alpha$ -synuclein transgenic mice, *Exp. Neurol.*, **285**, Pt A, 61-71, doi: 10.1016/j.expneurol.2016.09.004.
  71. Dallé, E., and Mabandla, M. V. (2018) Early life stress, depression and Parkinson's disease: a new approach, *Mol. Brain*, **11**, 18, doi: 10.1186/s13041-018-0356-9.
  72. Grigoriuță, M., Martínez-Martínez, A., Dagda, R. Y., and Dagda, R. K. (2020) Psychological stress phenocopies brain mitochondrial dysfunction and motor deficits as observed in a parkinsonian rat model, *Mol. Neurobiol.*, **57**, 1781-1798, doi: 10.1007/s12035-019-01838-9.
  73. Kong, H., Yang, L., He, C., Zhou, J. W., Li, W. Z., et al. (2019) Chronic unpredictable mild stress accelerates lipopolysaccharide-induced microglia activation and damage of dopaminergic neurons in rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **179**, 142-149, doi: 10.1016/j.pbb.2019.01.004.
  74. Mariathasan, S., Newton, K., Monack, D. M., Vucic, D., French, D. M., et al. (2004) Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf, *Nature*, **430**, 213-218, doi: 10.1038/nature02664.
  75. De Pablos, R. M., Herrera, A. J., Espinosa-Oliva, A. M., Sarmiento, M., Muñoz, M. F., et al. (2014) Chronic stress enhances microglia activation and exacerbates death of nigral dopaminergic neurons under conditions of inflammation, *J. Neuroinflammation*, **24**, 34, doi: 10.1186/1742-2094-11-34.
  76. Sugama, S., Sekiyama, K., Kodama, T., Takamatsu, Y., Takenouchi, T., et al. (2016) Chronic restraint stress triggers dopaminergic and noradrenergic neurodegeneration: Possible role of chronic stress in the onset of Parkinson's disease, *Brain Behav. Immun.*, **51**, 39-46, doi: 10.1016/j.bbi.2015.08.015.
  77. Dufour, B. D., and McBride, J. L. (2016) Corticosterone dysregulation exacerbates disease progression in the R6/2 transgenic mouse model of Huntington's disease, *Exp. Neurol.*, **283**, Pt. A, 308-317, doi: 10.1016/j.expneurol.2016.06.028.
  78. Mo, C., Renoir, T., and Hannan, A. J. (2014) Effects of chronic stress on the onset and progression of Huntington's disease in transgenic mice, *Neurobiol. Dis.*, **71**, 81-94, doi: 10.1016/j.nbd.2014.07.008.
  79. Scarpa, J. R., Jiang, P., Losic, B., Readhead, B., Gao, V. D., et al. (2016) Systems genetic analyses highlight a TGF $\beta$ -FOXO3 dependent striatal astrocyte network conserved across species and associated with stress, sleep, and Huntington's disease, *PLoS Genet.*, **12**, e1006137, doi: 10.1371/journal.pgen.1006137.
  80. Longinetti, E., Mariosa, D., Larsson, H., Almqvist, C., Lichtenstein, P., et al. (2017) Physical and cognitive fitness in young adulthood and risk of amyotrophic lateral sclerosis at an early age, *Eur. J. Neurol.*, **24**, 137-142, doi: 10.1111/ene.13165.
  81. Parkin Kullmann, J. A., Hayes, S., and Pamphlett, R. (2018) Is psychological stress a predisposing factor for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)? An online international case-control study of premorbid life events, occupational stress, resilience and anxiety, *PLoS One*, **13**, e0204424, doi: 10.1371/journal.pone.0204424.
  82. Rabkin, J., Goetz, R., Murphy, J. M., Factor-Litvak, P., Mitsumoto, H., and ALS COSMOS Study Group (2016) Cognitive impairment, behavioral impairment, depression, and wish to die in an ALS cohort, *Neurology*, **87**, 1320-1328, doi: 10.1212/WNL.0000000000003035.

## CURRENT VIEWS ON THE ROLE OF STRESS IN THE PATHOGENESIS OF CHRONIC NEURODEGENERATIVE DISEASES

### Review

L. G. Khaspekov

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

The review summarizes the results of studies on the cellular and molecular mechanisms mediating the impact of stress on the pathogenesis of neurodegenerative brain pathologies (Alzheimer's disease, Parkinson's disease, etc.) and presents current information on the role of stress in the hyperphosphorylation of tau protein, aggregation of beta-amyloid, and hyperactivation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis involved in the hyperproduction of factors that contribute to the pathogenetic role of stress in neurodegeneration. The data on the participation of microglia in the effects of stress on the pathogenesis of neurodegenerative diseases are presented.

**Keywords:** stress, neurodegeneration, dementia, Alzheimer's disease, Parkinson's disease

УДК 616-092.9

## ДЕЙСТВИЕ НЕОНАТАЛЬНЫХ ВВЕДЕНИЙ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОТОКСИНА НА ПОВЕДЕНИЕ И ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ИОНОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА В ГИППОКАМПЕ ВЗРОСЛЫХ КРЫС ПОСЛЕ ПСИХОГЕННОЙ ТРАВМЫ

© 2021 В.А. Никитина<sup>1</sup>, М.В. Захарова<sup>2</sup>, А.Н. Трофимов<sup>1</sup>, А.П. Шварц<sup>2</sup>,  
Г.В. Безнин<sup>1</sup>, С.Г. Цикунов<sup>1</sup>, О.Е. Зубарева<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», 197376 Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> ФГБНУ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,  
194223 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: zubareva@e-mail.ru

Поступила в редакцию 06.12.2020

После доработки 26.04.2021

Принята к публикации 28.04.2021

Согласно «двухударной» гипотезе формирования психонейропатологии, инфекционные заболевания, перенесённые в критические периоды раннего онтогенеза, нарушают нормальное развитие мозга, повышая чувствительность к стрессам в последующей жизни. Эти нарушения могут быть связаны с изменениями функциональной активности глутаматергической системы гиппокампа. В данной работе изучены особенности экспрессии генов ионотропных глутаматных NMDA (GluN1, GluN2a, GluN2b) и AMPA (GluA1, GluA2) рецепторов, а также транспортера глутамата EAAT2 в вентральном и дорзальном отделах гиппокампа крыс, получавших бактериальный липополисахарид (ЛПС) в течение третьей недели жизни и переживших витальный стресс (контакт с хищником – питоном) во взрослом возрасте. Тестирование производили через 25 дней после стресса. Нарушения были обнаружены в вентральном, но не дорзальном отделе гиппокампа. Нестрессированные крысы, которым неонатально вводили ЛПС, имели более низкий уровень белка GluN2b по сравнению с нестрессированным контролем, однако после стресса у них (но не у контрольных животных) уровень GluN2b значимо увеличивался. Различные реакции на стресс у экспериментальных и контрольных крыс выявлены также по показателям исследовательского поведения: в первую минуту после помещения в «Открытое поле» у стрессированных контрольных крыс активность увеличивалась, а у стрессированных экспериментальных – снижалась. Кроме того, стрессированные и нестрессированные крысы, которым в раннем возрасте вводили ЛПС, отличались большим временем, проведённым в открытых рукавах «Приподнятого крестообразного лабиринта» и пониженным уровнем кортикостерона в крови. Таким образом, воздействие бактериальным ЛПС в раннем постнатальном онтогенезе влияет на характер стрессиндуцированных изменений поведения и на особенности экспрессии генов субъединиц ионотропных рецепторов глутамата в гиппокампе после психогенной травмы, перенесённой во взрослом возрасте.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** липополисахарид, раннее развитие, гиппокамп, стресс-реактивность, NMDA-рецептор, AMPA-рецептор, кортикостерон, поведение.

DOI: 10.31857/S0320972521060129

### ВВЕДЕНИЕ

В последние годы активно обсуждается роль раннего опыта в развитии повышенной уязвимости к стресс-индуцированным психопатологическим состояниям [1, 2]. Эта проблема рас-

сматривается, в частности, в рамках «двухударной» гипотезы, согласно которой стрессы, инфекционные заболевания и другие патологические состояния, имевшие место в критические периоды раннего онтогенеза, нарушают нормальное развитие мозга, повышая чувствительность к стрессам, перенесённым в подростковом и взрослом возрасте [3–5]. В качестве одного из повреждающих факторов могут выступать бактериальные инфекции, экспериментальной моделью которых является введение элемента клеточной стенки грамотрицательных бактерий – липополисахарида (ЛПС, эндотоксин). Ранее было показано, что введение ЛПС в раннем онтогенезе может оказывать долговременное повреждающее действие на функции ЦНС,

Принятые сокращения: ЛПС – липополисахарид, эндотоксин; ОП – тест «Открытое поле»; ПКЛ – тест «Приподнятый крестообразный лабиринт»; ПТСР – посттравматическое стрессовое расстройство; AMPA –  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid ( $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота); EAAT2 – excitatory amino acid transporter 2 (возбуждающий аминокислотный транспортер 2); NMDA – N-methyl-D-aspartate (N-метил-D-аспарат).

\* Адресат для корреспонденции.



вызывая нарушение когнитивных функций и эмоционального поведения [6–11]. Ряд данных указывает на изменение стресс-реактивности животных, которым вводили ЛПС в раннем возрасте [12, 13].

Механизмы ЛПС-индуцированных нарушений поведения и стресс-реактивности остаются малоизученными. В качестве одного из возможных механизмов рассматривается нарушение функциональной активности глутаматергической системы мозга, связанное, в частности, с нарушением формирования ионотропных NMDA- и AMPA-глутаматных рецепторов [14]. Эти рецепторы имеют сложную субъединичную структуру. NMDA-рецепторный комплекс представляет собой гетеротетрамер, состоящий из облигатной GluN1-субъединицы и вариантных субъединиц GluN2 (a–d) либо GluN3 (a, b), благодаря которым обеспечивается функциональная и региональная вариативность NMDA-рецепторов [15]. AMPA-рецепторы состоят из 4 субъединиц GluA (1–4). AMPA-рецепторы, содержащие субъединицу GluA2, непроницаемы для ионов кальция [16]. Формирование характерного для взрослых особей субъединичного состава NMDA- и AMPA-рецепторов в мозге крыс происходит в первые недели жизни [17–21]. Введение ЛПС в эти сроки приводит к краткосрочным и долговременным изменениям экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов в гиппокампе и коре мозга [10, 11, 14].

Хорошо известно, что NMDA- и AMPA-рецепторы принимают участие в реализации когнитивных функций [22–25] и психоэмоциональных реакций [26]. Экспрессия генов этих рецепторов в гиппокампе изменяется при стрессе [27, 28]. Предполагается, что ионотропные глутаматные рецепторы опосредуют угасание страха; нарушение этой реакции играет ключевую роль в патофизиологии посттравматического стрессового расстройства (ПТСР) [29, 30]. Использование антагонистов NMDA-рецепторов позволяет предотвратить стресс-индуцированные гормональные и поведенческие нарушения [31, 32], что доказывает их вовлеченность в регуляцию этих реакций.

Ещё одним белком, влияющим на активность глутаматергической системы, является транспортёр глутамата EAAT2 (GLT-1). Он продуцируется в основном астроцитами и обеспечивает обратный захват этими клетками до 90% глутамата из синаптической щели, являясь, таким образом, основным регулятором уровня внеклеточного глутамата [33]. Изменение продукции EAAT2 в гиппокампе отмечается при выученной беспомощности, являющейся мо-

делью депрессии [34], и у взрослых крыс, переживших социальный стресс (разлучение с матерью) в неонатальном периоде [35]. Особенности экспрессии гена, кодирующего EAAT2, в мозге взрослых стрессированных животных, которым в раннем возрасте вводили ЛПС, ранее не изучались.

Целью данной работы явилось исследование сочетанных влияний неонатальных введений ЛПС и витального стресса, перенесённого во взрослом возрасте, на поведение, уровень кортикостерона, а также продукцию EAAT2 и субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов в дорзальной и вентральной областях гиппокампа крыс. Модель стресса (контакт крыс с хищником – питоном) и сроки тестирования были выбраны на основе исследований, проведённых нами ранее, так как было показано, что данный вид стресса влияет на экспрессию изучаемых генов [36]. Необходимость дифференциального анализа вентрального и дорзального отделов гиппокампа была обусловлена функциональными различиями этих областей, а также тем, что стресс по-разному регулирует экспрессию генов рецепторов глутамата и EAAT2 в его дорзальном и вентральном отделах [27, 37].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Объект исследования. Общий план экспериментов.** Исследование выполнено на самцах крыс Вистар с соблюдением принципов гуманности (Директивы Европейского Сообщества № 86/609 ЕС), одобренных Локальным этическим комитетом ФГБНУ «ИЭМ». Схема эксперимента представлена на рис. 1. Крысят содержали с матерями, по одному помёту в клетке (всего 14 помётов). Количество крысят в помёте выравнивали (в помёте оставляли не более 7–8 крысят), часть самок при необходимости оставляли, но в экспериментах не использовали. Бактериальный липополисахарид (серотип 055:B5 *Escherichia coli*, 50 мкг/кг; «Sigma-Aldrich», США) либо апирогенный физиологический раствор вводили внутрибрюшинно 1 раз в сутки, на 15, 18 и 21 дни жизни. Крысят разлучали с матерями не более чем на одну минуту. В каждом помёте были и контрольные, и экспериментальные животные. В возрасте 1 мес. крысят отсаживали от самки. Дозировка ЛПС была выбрана на основе ранее проведённых исследований как умеренно пирогенная и влияющая на экспрессию генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов [10].

**Стрессирование.** В возрасте 3 мес. половину экспериментальных ( $n = 16$ ) и контрольных

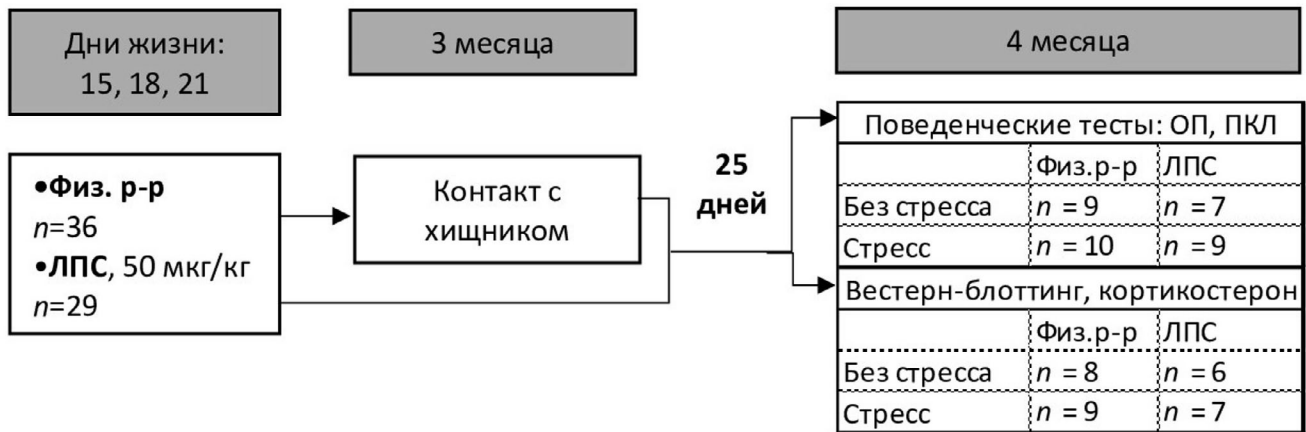


Рис. 1. Схема эксперимента

( $n = 19$ ) животных подвергали стрессу, заключающемуся в переживании обстоятельств гибели сородича и угрозы собственной жизни от действий хищника – питона [38]. Для этого группу, состоящую из опытных и контрольных крыс (в общей сложности 17–20 животных), помещали в террариум к голодному питону, одна из них становилась жертвой пищевых потребностей хищника. Остальные крысы, находившиеся в террариуме, подвергались переживанию стрессовой ситуации: они находились в установке ещё в течение 20–25 мин. Затем крыс изымали из террариума и возвращали в домашние клетки, в которых они содержались до проведения поведенческого тестирования или забора биологического материала для дальнейшего анализа. Для сравнения использовали нестрессированных экспериментальных и контрольных животных.

Поскольку нас интересовали долговременные стресс-индуцированные изменения, эксперименты проводили через 25 суток после стресса и в аналогичном возрасте у нестрессированных животных. Разные группы контрольных и экспериментальных крыс были использованы для проведения биохимических (физ. р-р,  $n = 17$ ; ЛПС,  $n = 13$ ) и поведенческих (физ. р-р,  $n = 19$ ; ЛПС,  $n = 16$ ) исследований.

**Определение уровня белка методом вестерн-блоттинга.** Исследование уровня белков субъединиц NMDA (GluN2a, GluN2b) и AMPA (GluA1, GluA2) рецепторов проводили методом вестерн-блоттинга. Животных декапитировали, мозг выделяли целиком, немедленно замораживали и хранили при температуре  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Вентральный и дорзальный гиппокамп выделяли на срезах, производимых на микротоме-криостате Thermo Scientific MICROM HM («Thermo Scientific», США), при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , согласно атласу [39]. Схема выделения структур представлена

на рис. S1 в Приложении. Выделенные структуры мозга гомогенизировали на льду в оптимизированном лизирующем буфере, предложенном Корес et al. [40], с добавлением  $1\times$  коктейля ингибиторов протеаз (Pierce Protease Inhibitor Tablets, «Thermo Fisher Scientific», США), инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре, нерастворённые остатки удаляли центрифугированием (15 мин, 14 000 g,  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , «Thermo Scientific»). Концентрацию белка в пробе определяли с помощью модифицированного метода Лоури [41]. Белковый супернатант был разбавлен в соотношении 1/1  $2\times$  буфером для нанесения (125 mM Tris-HCl, pH 6,8; 40% (v/v) глицерин; 4% додецилсульфат натрия; 2,5%  $\beta$ -меркаптоэтанол; 0,02% бромфеноловый синий) и инкубировался в термостате («BioSan», Латвия) в течение 15 мин при  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Электрофоретическое разделение проводили в восстанавливающих и денатурирующих условиях [42] в 7%-ном полиакриламидном геле вместе со стандартом молекулярного веса (Thermo Scientific PAGE Ruler Prestained Protein Ladder 10–170 кДа; «Thermo Fisher Scientific», США) при 125 В. В одинаковом объёме на дорожки наносили по 6 мкг белка, т.к. это количество позволяло попасть в линейную область денситометрического анализа для всех используемых антител в наших условиях. Вместе с анализируемыми образцами на каждый гель наносили образец-калибратор, полученный при смешивании нескольких образцов от животных из разных групп.

Белок переносили на нитроцеллюлозную мембрану (диаметр пор 45 мкм) полусухим переносом с  $1\times$  буфером для переноса Invitrogen Power Blotter 1-Step Transfer Buffer («Thermo Fisher Scientific»), согласно инструкции производителя. После переноса мембрану окрашива-

ли 0,1%-ным раствором красителя Ponceau S в 5%-ной уксусной кислоте («Merck KGaA», ФРГ), результаты документировали с помощью системы гель-визуализации ChemiDoc MP («Bio-Rad», США). В качестве блокирующего агента использовали обезжиренное сухое молоко («Sigmaaldrich», Швейцария) (5%-ный раствор, 1,5 ч при комнатной температуре). Затем мембрану трижды промывали буфером PBS-T (0,01 М фосфатный буфер, pH 7,4; 137 мМ NaCl; 2,7 мМ KCl, содержащий 0,1% (v/v) Tween 20) и инкубировали в течение ночи при +4 °C в растворе первичных антител против GluN2a (ab169873, кроличьи поликлональные); GluN2b (ab65783, кроличьи поликлональные), GluA1 (ab109450, кроличьи моноклональные); GluA2 (ab106515, мышинные моноклональные); EAAT2 (ab205248, кроличьи моноклональные). В работе использовали первичные антитела фирмы «Abcam», Великобритания в разведении 1/1000. Для детекции первичных антител (для GluN2a/2b, GluA1 и EAAT2) к мембране добавляли антитела против кроличьих иммуноглобулинов G (31460, 1/60 000, Pierce Goat anti-rabbit IgG-HRP, «Thermo Fisher Scientific»), в остальных случаях к мембране добавляли антитела против мышинных иммуноглобулинов G (ab6808, 1/40 000, Sheep Anti-Mouse IgG H&L (HRP), («Abcam»). Все растворы антител и блокирующего агента были приготовлены в фосфатно-солевом буферном растворе PBS-T; в этом же буфере проводили 3–6-кратную промывку между шагами. Хемилюминесцентный сигнал получали с хемилюминесцентного субстрата SuperSignal™ West Pico PLUS («Thermo Fisher Scientific») и документировали с помощью системы ChemiDoc MP («Bio-Rad», США). Денситометрический анализ проводили с помощью программы Image Lab 6.0.1 software (Bio-Rad): оптическую плотность сигнала нормировали по отношению к образцу-калибратору по сигналу Ponceau S (тотальный белок) соответствующей дорожки.

**Определение содержания кортикостерона в крови.** Уровень кортикостерона определяли в сыворотке периферической крови, взятой при декапитации животных, методом конкурентного иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов для количественного определения кортикостерона (Corticosterone (Human, Rat, Mouse) ELISA (RE52211), «TECAN Trading», Швейцария), согласно рекомендациям производителя. Спектрофотометрический анализ производили на Microplate Reader Immunochem-2100 («HTI Diagnostics», США). Расчёт значений концентраций кортикостерона производили методом линейной рег-

рессии. Все эксперименты проводились в двух независимых повторах.

**Поведенческое тестирование.** Ориентировочно-исследовательское поведение и уровень тревожности крыс оценивали в тестах «Открытое поле» (ОП) и «Приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ). Использовали круглое открытое поле диаметром 1 м, освещённость 10 лк. Крысу помещали в центр поля, длительность теста составляла 3 мин. Анализировали общую длину пройденного пути (как показатель двигательной и исследовательской активности), дистанцию, пройденную за первую минуту (как показатель ориентировочно-исследовательского поведения), время нахождения в центральной и периферической областях (показатель тревожности), а также проводили анализ общей стратегии поведения (характер трека, подробно описано в результатах).

Тест ПКЛ использовали для оценки уровня тревожности. Установка состояла из центральной платформы (10 × 10 см) с двумя открытыми и двумя закрытыми «рукавами» (50 × 10 см), приподнятыми на 40 см над полом. Закрытые «рукава» имели 30-сантиметровые стены и освещённость 5 лк. На открытых «рукавах» освещённость составляла 10 лк. Тест длился 5 мин. Крысу помещали в один из закрытых «рукавов» лабиринта. Измеряли время нахождения в закрытом и открытом рукавах, время выглядывания из закрытых рукавов, число заходов в открытые и закрытые рукава, процент времени, проведённого в открытых рукавах, и время груминга в закрытых «рукавах». Все поведенческие эксперименты регистрировали с помощью веб-камер, размещённых над установками. Анализ видеозаписей производился с использованием пользовательского программного обеспечения (Field-4W, Pole-7, Pole\_Krest), разработанного в Физиологическом отделе им. И.П. Павлова ФГБНУ «ИЭМ».

**Статистическую обработку** производили в программе SPSS Statistics 22 («IBM Corp.», США) с использованием критерия Колмогорова–Смирнова для оценки нормальности распределения, критерия Ливиня (проверка равенства дисперсий), двухфакторного дисперсионного анализа, *t*-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони в качестве апостериорного теста. Критерий  $\chi^2$  Пирсона был использован для анализа межгрупповых различий в частотах встречаемости разных типов треков в тесте ОП. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ . Данные на графиках представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка. Диаграммы построены с применением программы GraphPad Prism 8 («GraphPad Software, Inc.», США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

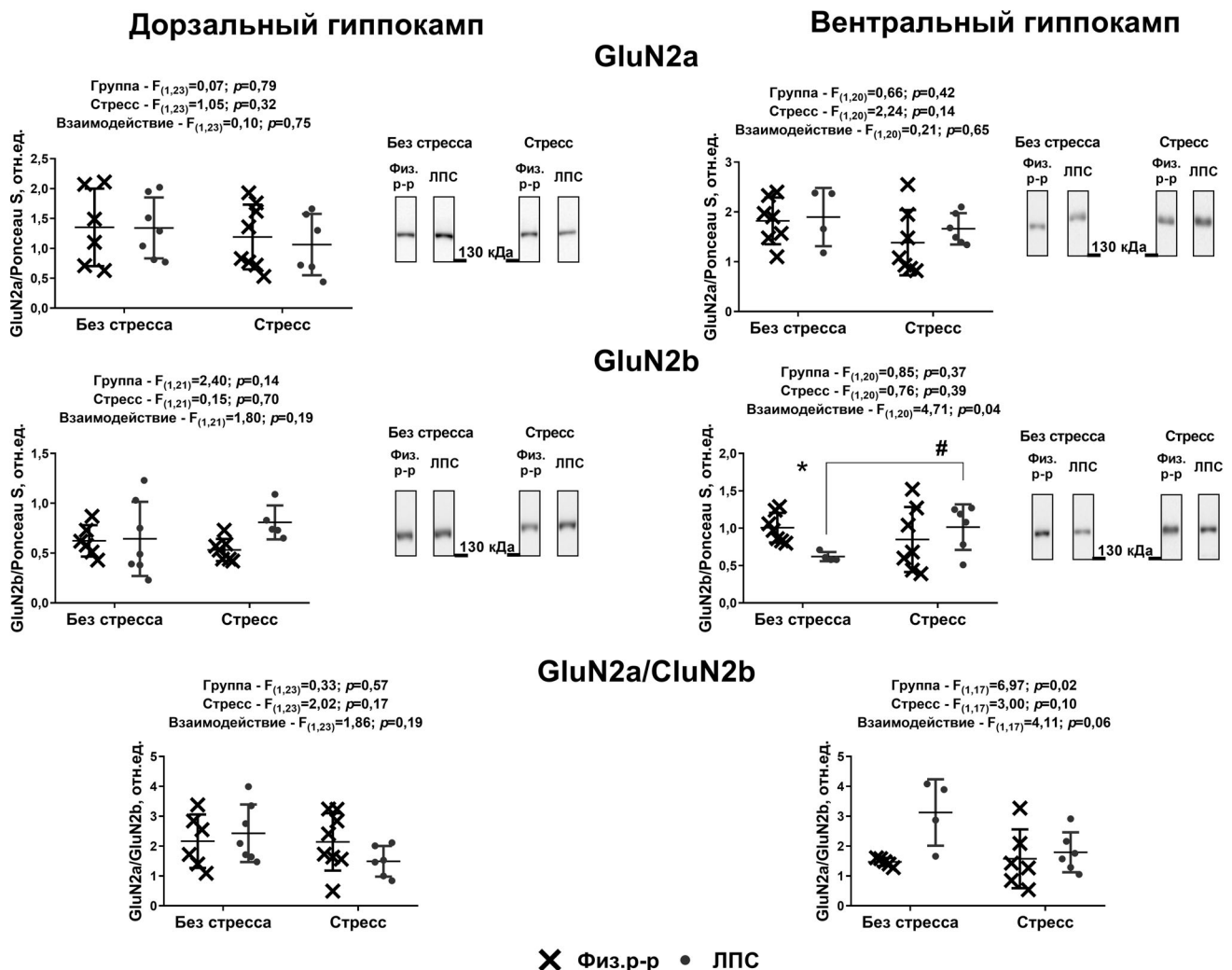
Использованная доза ЛПС 50 мкг/кг не влияла значимо на развитие животных – динамику веса тела (количественные данные представлены на рис. S2 и в табл. S1 в Приложении).

Экспрессия генов субъединиц инотропных глутаматных рецепторов была исследована на уровне белка. На рис. S3 в Приложении представлены все проанализированные изображения мембран. Более выраженные межгрупповые различия выявлены в вентральном (по сравнению с дорзальным) отделе гиппокампа. В группе нестрессированных крыс более низкий уровень GluN2b-субъединицы NMDA-рецепторов обнаружен у животных, которым в раннем возрасте вводили ЛПС ( $n = 4$ ) по сравнению с конт-

ролем ( $n = 6$ ) (рис. 2,  $t = 4,75$ ;  $p = 0,002$ , достоверно с учётом поправки Бонферрони).

Выявлено также влияние введений ЛПС на соотношение содержания субъединиц GluN2a/GluN2b: оно было выше у крыс с введением эндотоксина ( $F_{(1,17)} = 6,97$ ;  $p = 0,02$ ). Особенно это проявлялось в обычных (без стресса) условиях (рис. 2).

Различные реакции на стресс у экспериментальных и контрольных крыс выявлены по показателям экспрессии GluN2b-субъединицы NMDA-рецепторов и GluA1-субъединицы AMPA-рецепторов (рис. 2 и 3; взаимодействие факторов группы и стресса, соответственно,  $F_{(1,20)} = 4,71$ ;  $p = 0,04$  и  $F_{(1,19)} = 4,87$ ;  $p = 0,04$ ). Уровень белка GluN2b-субъединицы у экспериментальных крыс увеличивался после стресса



**Рис. 2.** Экспрессия генов субъединиц NMDA-рецепторов в гиппокампе экспериментальных и контрольных крыс. Количество животных в группах  $n = 4-8$ . Каждая точка означает одно животное. F – Критерий Фишера, двухфакторный ANOVA; \* – достоверные отличия от контрольной группы, # достоверные отличия от группы без стресса;  $p < 0,05$ ,  $t$ -критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. Приведены примеры репрезентативных бендов для животных из всех групп

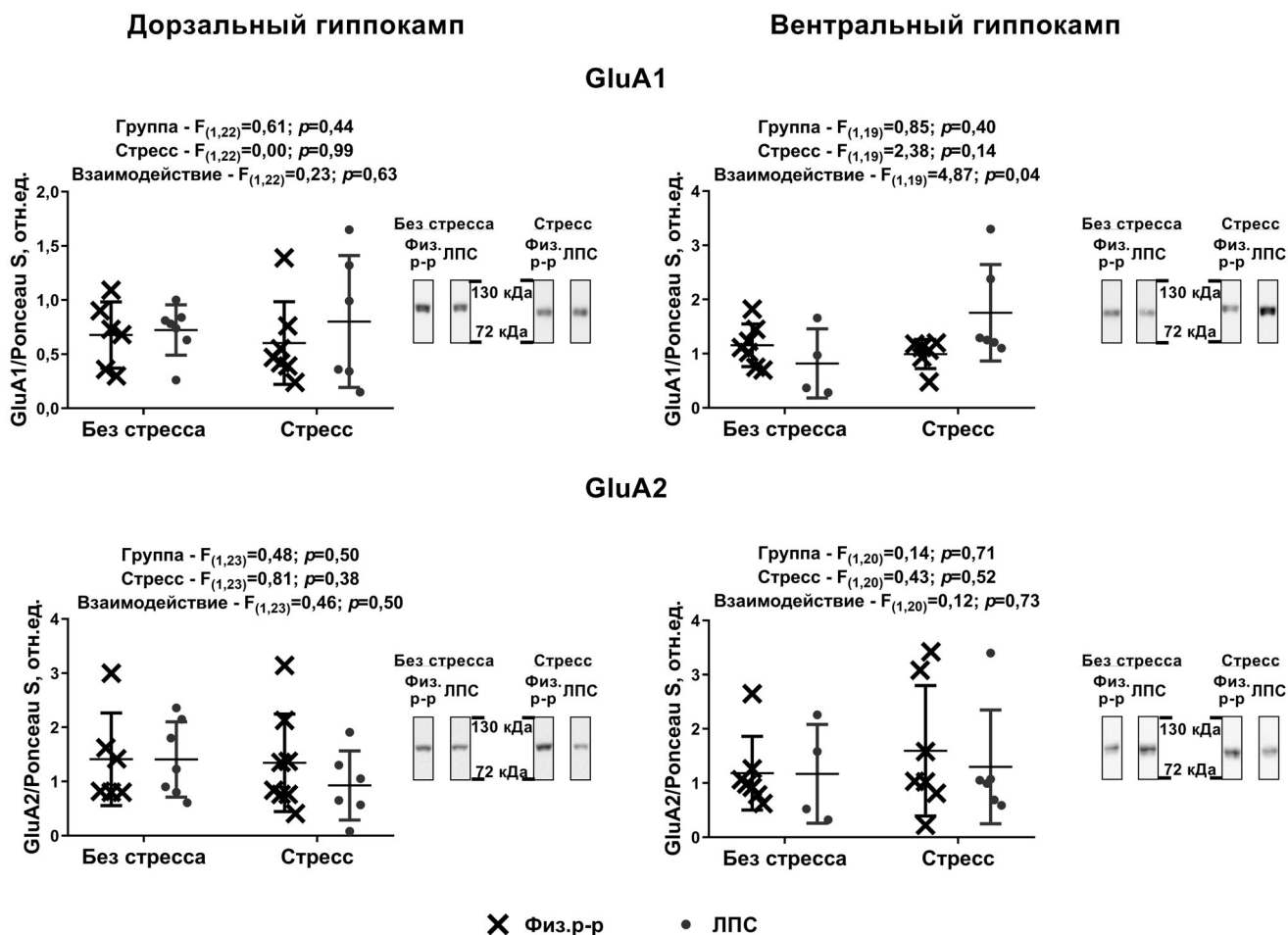


Рис. 3. Экспрессия генов субъединиц AMPA-рецепторов в гиппокампе экспериментальных и контрольных крыс. Количество животных в группах  $n = 4-8$ . Каждая точка означает одно животное. F – Критерий Фишера, двухфакторный ANOVA. Приведены примеры репрезентативных бендов для животных из всех групп

( $t = 3,04; p = 0,025$ ), у контрольных – имел тенденцию к снижению в сравнении с соответствующей нестрессированной группой.

Никаких достоверных изменений не показано в отношении продукции EAAT2 как в вентральном, так и дорзальном отделе гиппокампа (рис. 4).

Таким образом, эффекты неонатального введения ЛПС на экспрессию генов субъединиц ионотропных рецепторов глутамата выявлены в вентральном, но не дорзальном отделе гиппокампа. Наиболее выраженные нарушения в обычных условиях и стресс-индуцированные изменения обнаружены в отношении GluN2b-субъединицы NMDA-рецепторов. Для того чтобы проверить, могут ли эти изменения влиять на поведение после психогенной травмы, нами в той же экспериментальной парадигме было проведено тестирование крыс в «Открытом поле» и «Приподнятом крестообразном лабиринте», поскольку поведение в этих тестах зависит

от активности GluN2b-содержащих NMDA-рецепторов [43, 44].

Результаты тестирования поведения показали, что в тесте ОП (рис. 5) общая длина пройденной дистанции достоверно не отличалась в группах, однако активность в течение первой минуты (показатель ориентировочно-исследовательского поведения) была различной: у контрольных крыс, перенёсших стресс, она увеличивалась, у экспериментальных – снижалась (взаимодействие факторов стресса и группы:  $F_{(1,31)} = 6,32; p = 0,017$ ). Достоверных различий по времени нахождения в центральной и периферической зоне поля не выявлено, однако характер треков в группах различался. Было выделено три типа трека. Первый, с преимущественным нахождением на периферии (обследование всего поля), отмечался у большинства нестрессированных контрольных и экспериментальных животных (соответственно 66,7% и 70%), а также у 100% контрольных стрессированных крыс.

## Дорзальный гиппокамп

## Вентральный гиппокамп

## ЕААТ2

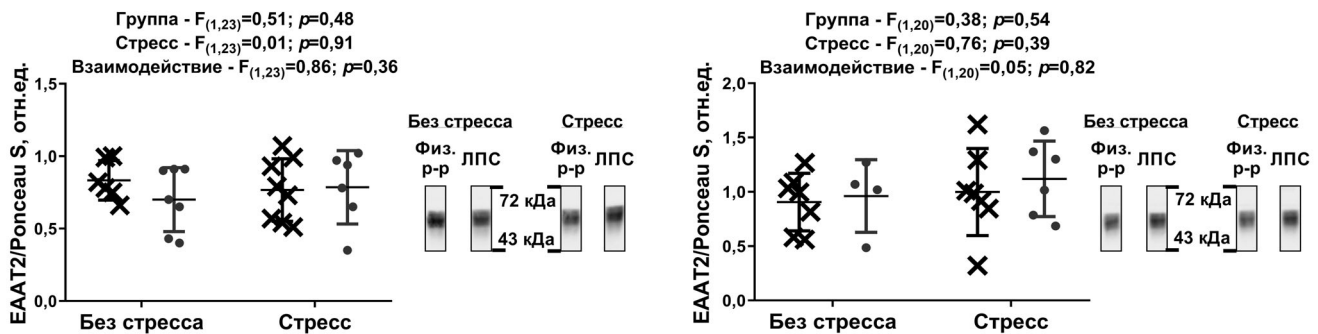


Рис. 4. Экспрессия генов, кодирующих ЕААТ2, в гиппокампе экспериментальных и контрольных крыс. Количество животных в группах  $n = 4-8$ . Каждая точка означает одно животное. F – Критерий Фишера, двухфакторный ANOVA. Приведены примеры репрезентативных бендов для животных из всех групп

Второй, с частыми заходами в центральную область поля, был характерен для трети контрольных и экспериментальных крыс без стресса. Третий тип трека – обследование только части поля – был описан только у 44,4% экспериментальных крыс, переживших стресс. Очевидно, он свидетельствует о пониженной исследовательской активности, а также, возможно, повышенной тревожности. Частота встречаемости разных типов треков достоверно различается в четырёх группах ( $\chi^2 = 16,4$ ;  $p = 0,012$ ).

В тесте ПКЛ длительность нахождения на открытых «рукавах» была выше у стрессированных и нестрессированных экспериментальных крыс (рис. 6, а; фактор группы:  $F_{(1,27)} = 4,70$ ;  $p = 0,04$ ), аналогичные результаты получены для процента времени, которое животные проводят в открытых рукавах (фактор группы:  $F_{(1,27)} = 4,56$ ;  $p = 0,04$ ; рис. S4 и табл. S2 в Приложении), этот результат соответствовал тенденции меньшего времени, проведённого экспериментальными крысами на периферии «Открытого поля» ( $F_{(1,31)} = 2,98$ ;  $p = 0,09$ ). Однако эти результаты, по-видимому, нельзя однозначно трактовать как пониженную тревожность, так как у стрессированных экспериментальных крыс при этом выявляется усиление груминга в закрытых «рукавах» (рис. 6, б; взаимодействие факторов стресса и группы:  $F_{(1,28)} = 4,29$ ;  $p = 0,048$ ). По длительности нахождения в закрытых «рукавах», длительности актов вылаживания из них, а также числу заходов в открытые и закрытые «рукава» различий не было выявлено (данные представлены на рис. 5 и в табл. S2 в Приложении).

Таким образом, поведенческие реакции на стресс были различными у крыс с неонатальным введением ЛПС и физиологического раствора.

Для проверки предположения о том, что эти особенности могут быть связаны с изменением уровня кортикостерона, мы проанализировали его содержание в крови контрольных и экспериментальных крыс, имевших и не имевших психогенную травму. Было показано, что введение эндотоксина в раннем возрасте влияет на уровень кортикостерона в крови. Он был ниже у экспериментальных крыс, как подвергавшихся, так и не подвергнутых стрессу (рис. 7, фактор введения ЛПС:  $F_{(1,23)} = 6,22$ ;  $p = 0,02$ ).

Таким образом, проведённое исследование показало, что введение бактериального ЛПС в критический для формирования ионотропных глутаматных рецепторов период раннего постнатального онтогенеза (фактор группы) влияет на соотношение экспрессии генов, кодирующих субъединицы GluN2a/GluN2b в клетках вентрального гиппокампа, на поведение в тесте ПКЛ и на уровень кортикостерона в крови. Различные реакции на стресс у экспериментальных и контрольных крыс (сочетанное влияние факторов группы и стресса) выявлены в отношении экспрессии генов GluN2b-субъединицы NMDA-рецепторов и GluA1-субъединицы AMPA-рецепторов, а также для показателей исследовательского и эмоционального поведения.

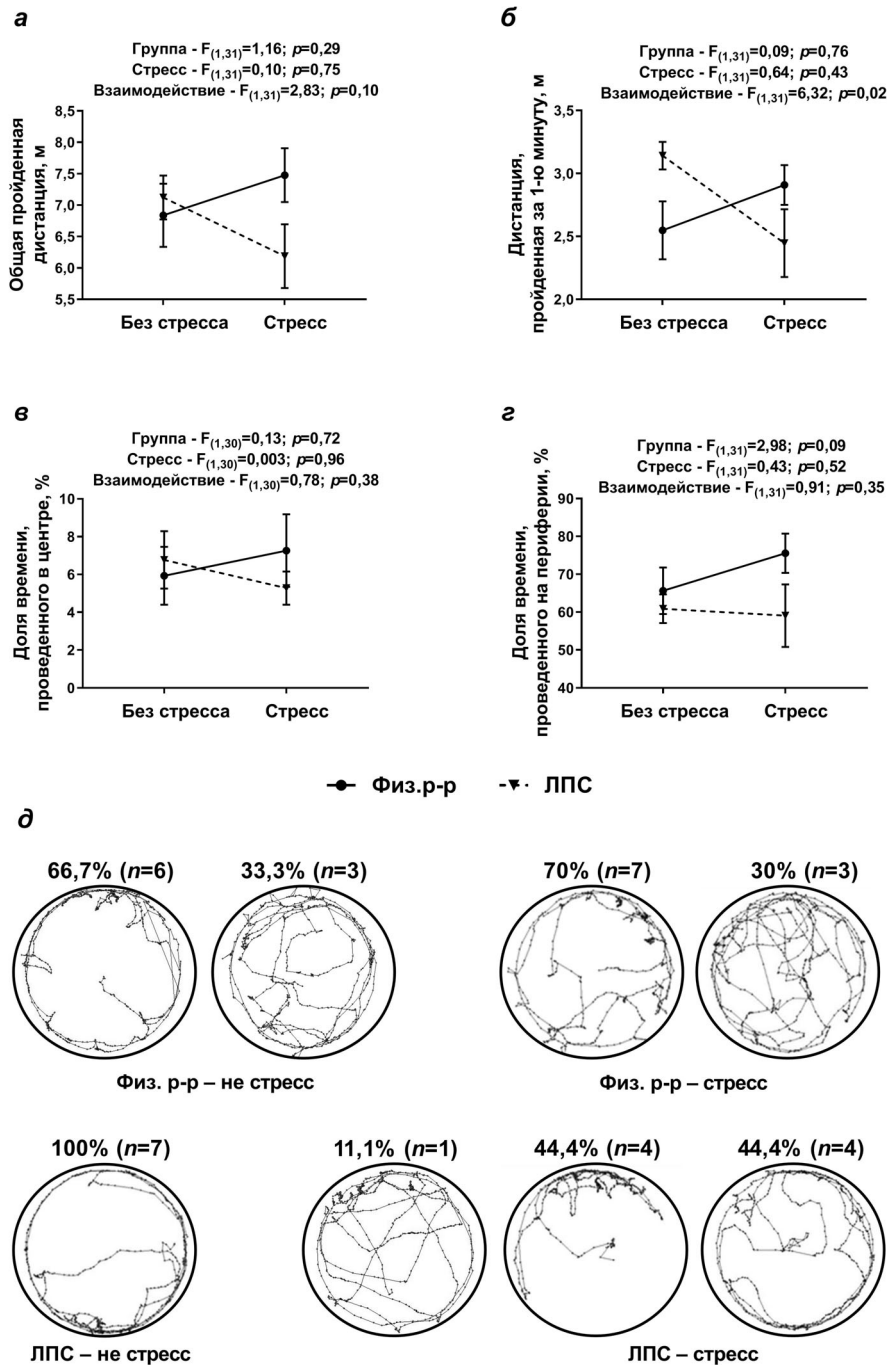
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В работе впервые исследованы особенности экспрессии генов субъединиц ионотропных рецепторов глутамата в гиппокампе крыс после сочетанного воздействия неонатальных введений ЛПС и психогенной травмы, перенесённой во взрослом возрасте.

Значимое влияние фактора группы (введенной ЛПС) показано для поведения в тесте ПКЛ и для соотношения GluN2a/GluN2b в вентральном гиппокампе. Нами выявлено также, что нестрессированные экспериментальные крысы отличаются пониженным уровнем белка GluN2b

в вентральном отделе гиппокампа. Увеличение соотношения GluN2a/GluN2b ранее было показано у взрослых крыс, перенёсших вирусную инфекцию пренатально (после введения беременным самкам синтетической молекулы polyI:C), однако в этом случае соотношение увеличива-

**Открытое поле**



**Рис. 5.** Поведение в тесте «Открытое поле»: а – общая дистанция, б – дистанция, пройденная в течение первой минуты, в – время в центральной области, г – время на периферии, д – типы треков. F – Критерий Фишера, двухфакторный ANOVA; n – количество животных

## Приподнятый крестообразный лабиринт

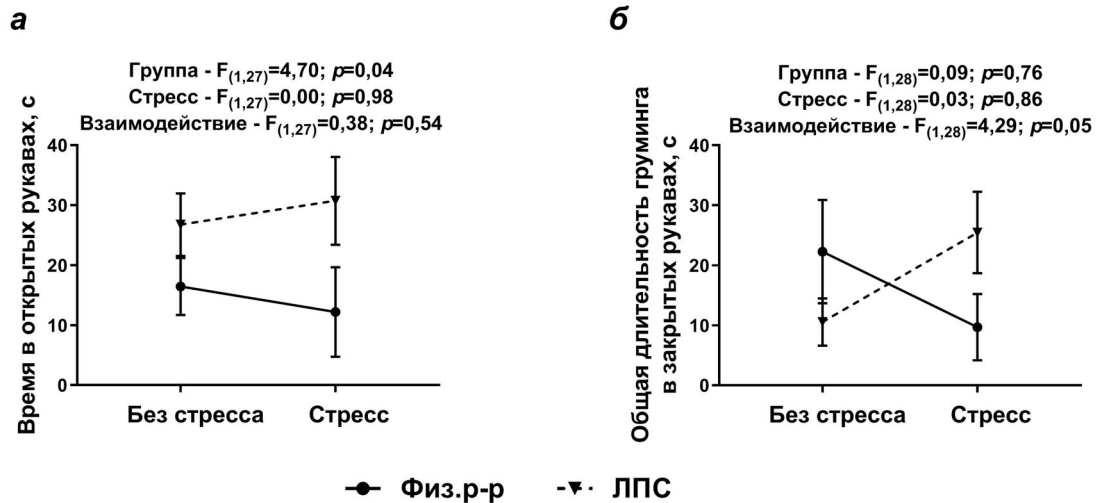


Рис. 6. Поведение в тесте «Приподнятый крестообразный лабиринт»: а – время в открытых рукавах, б – время груминга в закрытых рукавах. F – Критерий Фишера, двухфакторный ANOVA

лось за счёт усиления продукции GluN2a-субъединицы [45]. Аналогично повышение продукции мРНК субъединицы GluN2a отмечено у взрослых крыс, которым на 14 день жизни однократно вводили достаточно высокую дозу ЛПС (100 мкг/кг) [14]. Соотношение GluN2a/GluN2b в этом случае не оценивали. В исследованиях, проведённых нами ранее на подростках крыс, которым вводили ЛПС в течение третьей недели жизни, выявлено снижение уровня белка GluN2b-субъединицы и увеличение соотношения GluN2a/GluN2b в дорзальном и вентраль-

ном отделах гиппокампа [11], однако у взрослых животных после аналогичных введений ЛПС, напротив, нами было обнаружено увеличение уровня мРНК GluN2b [10]. Активность NMDA- и AMPA-рецепторов напрямую связана с долговременной потенциацией нейронов гиппокампа; неонатальные введения ЛПС приводят к её нарушению у неполовозрелых животных [11, 46–48]. Нужно отметить, что более выраженные изменения обнаружены нами в вентральном отделе гиппокампа. Ранее Onufriev et al. [49] было показано, что введение ЛПС взрослым крысам вызывает различную динамику изменений активности клеток вентрального и дорзального отделов гиппокампа (по показателям долговременной потенциации и экспрессии генов провоспалительных цитокинов): максимальная реакция в дорзальном отделе гиппокампа отмечалась раньше, в вентральном – позднее.

ЛПС-индуцированные перестройки, происходящие в субъединичном составе ионотропных рецепторов глутамата, могут влиять на поведение [43, 44]. Нарушение исследовательского поведения и изменение уровня тревожности после неонатальных введений ЛПС у взрослых животных ранее были показаны во многих исследованиях [46, 50–52]. В частности, введение ЛПС на третьей неделе жизни приводило у взрослых крыс к нарушению обследования новых объектов [53] и снижению количества стоек с упором в тесте ОП [10]. Признаки тревожно-депрессивного состояния отмечаются у взрослых крыс и мышей, которым вводили ЛПС на 1 либо на 3 и

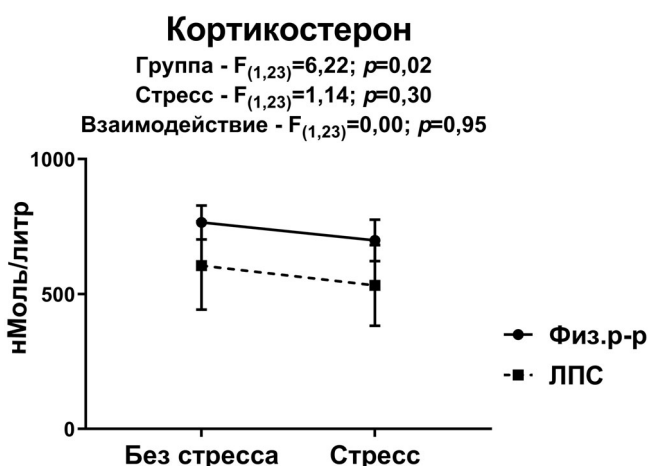


Рис. 7. Уровень кортикостерона в сыворотке крови контрольных (сплошная линия) и экспериментальных (пунктирная линия) крыс в обычных условиях и после стресса. F – Критерий Фишера, двухфакторный ANOVA. Количество животных в группах  $n = 6-8$



5 дни жизни [46, 50, 54]. Однако другие авторы [55] отмечают пониженную тревожность (по времени пребывания на открытых рукавах ПКЛ) у подростков крыс, которым вводили 100 мкг/кг ЛПС на 5 сутки жизни. Снижение времени нахождения в открытых рукавах ПКЛ отмечалось нами ранее у взрослых крыс, которым вводили ЛПС в течение третьей недели жизни [10].

Основная идея настоящего исследования заключалась в изучении особенностей реакции на психогенную травму у взрослых крыс, которым вводили ЛПС в раннем возрасте. Экспериментальные ситуации угрозы жизни, в частности контакта лабораторных грызунов с хищником (или его запахом), часто используются для моделирования ПТСР [56]. Для данного расстройства характерно отсроченное развитие психоневрологических нарушений [57]. Ранее модель, использованная нами в данном исследовании, была применена для анализа динамики постстрессовых изменений экспрессии генов субъединиц NMDA- и AMPA-рецепторов в гиппокампе, медиальной префронтальной коре и миндалевидном теле крыс. Наиболее выраженные изменения были выявлены в гиппокампе через 25 суток после стресса [36]. Поэтому этот срок был использован в данной работе для оценки особенностей животных, которым неонатально вводили ЛПС. В данной работе, в отличие от ранее проведённых исследований, мы не обнаружили статистически значимого влияния фактора стресса на изучаемые показатели. Возможно, это связано с индивидуальными особенностями животных. Данный феномен описан в клинических и экспериментальных работах: ПТСР развивается только у части стрессированных людей и животных [56, 58]. Тем не менее в данной работе крысы, которым вводили ЛПС, показали большую стресс-реактивность по изменению уровня белка GluN2b. Нами не выявлено изменений продукции белка EAAT2 в гиппокампе крыс через 25 дней после психогенной травмы. Ранее было показано снижение экспрессии данного белка в гиппокампе хронически стрессированных мышей [59]. Очевидно, использованный нами стресс был недостаточно сильным для изменения этого показателя.

Основной результат проведённого нами исследования заключается в выявлении сочетанных влияний неонатальных введений ЛПС и психогенной травмы на экспрессию генов GluN2b-субъединицы NMDA-рецепторов и GluA1-субъединицы AMPA-рецепторов, а также на показатели исследовательского и эмоционального поведения. В отношении экспрессии генов субъединиц ионотропных рецепторов глутамата

подобное исследование проведено впервые. При этом исследования особенностей стресс-реактивности у животных, которым неонатально вводили ЛПС, по поведенческим и гормональным показателям проводились и ранее. Так, Shanks et al. [60] обнаружили повышенный выброс адренокортикотропного гормона (АКТГ) и кортикостерона в ответ на ограничение движений у взрослых крыс, которым вводили эндотоксин на 3 и 5 сутки жизни. Кроме того, у экспериментальных животных отмечалось снижение чувствительности к глюкокортикоидам, то есть нарушались механизмы отрицательной обратной связи регуляции стресс-реакции. Аналогичные результаты – более сильная или пролонгированная реакция на стресс (по уровню кортикостерона) при введении ЛПС в раннем возрасте – получены и в других работах [13, 46]. При этом Walker et al. [12], вводившие ЛПС в те же сроки, отмечают у взрослых экспериментальных крыс ослабление гормонального ответа на трёхдневный комбинированный стресс, хотя на поведенческом уровне стресс-реактивность экспериментальных животных была выше, чем в контроле. В настоящем исследовании крысы, которым вводили эндотоксин в течение третьей недели жизни, имели более низкий уровень кортикостерона как в обычных условиях, так и через 25 дней после психогенной травмы. Самые низкие концентрации кортикостерона отмечены у крыс с введением ЛПС, перенёсших стресс. В ещё одном независимом исследовании, проведённом нами ранее [9], также был выявлен низкий уровень кортикостерона у нестрессированных крыс, которым в течение третьей недели жизни трижды вводили ЛПС в дозировках 25 либо 50 мкг/кг. Возможно, различия в полученных результатах связаны с различными дозировками эндотоксина и различными сроками его введения. Нужно также отметить, что снижение уровня глюкокортикоидов в крови и нарушение механизмов отрицательной обратной связи характерно для посттравматических стрессовых расстройств [61, 62], моделью которых предположительно является использованное нами стрессорное воздействие.

В целом, проведённое нами исследование показывает, что воздействие бактериальным ЛПС в раннем постнатальном онтогенезе влияет на характер стресс-индуцированных изменений поведения и на особенности экспрессии генов субъединиц ионотропных рецепторов глутамата в гиппокампе после психогенной травмы, перенесённой во взрослом возрасте. На возможную взаимосвязь этих нарушений указывают, в частности, результаты Lei et al. [43], показавшие изменение

активности животных в «Открытом поле» после введения антагониста GluN2b-содержащих рецепторов рилснемдаза. Окончательный вывод о связи выявленных нами нейрхимических и поведенческих изменений может быть сделан только после проведения дополнительных нейрофармакологических исследований.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 17-04-02116).

**Благодарности.** Спектрофотометрические исследования и визуализация мембран выполнены на базе Центра коллективного пользования научного оборудования для физиологических

исследований ИЭФБ им. И.М. Сеченова РАН.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов.

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 86, вып. 6, 2021.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lee, R. S., Oswald, L. M., and Wand, G. S. (2018) Early life stress as a predictor of co-occurring alcohol use disorder and post-traumatic stress disorder, *Alcohol. Res.*, **39**, 147-159.
- Fisher, P. A., Beauchamp, K. G., Roos, L. E., Noll, L. K., Flannery, J., and Delker, B. C. (2016) The neurobiology of intervention and prevention in early adversity, *Annu. Rev. Clin. Psychol.*, **12**, 331-357, doi: 10.1146/annurev-clinpsy-032814-112855.
- Van Camp, G., Cigalotti, J., Bouwalerh, H., Mairesse, J., Gatta, E., et al. (2018) Consequences of a double hit of stress during the perinatal period and midlife in female rats: mismatch or cumulative effect? *Psychoneuroendocrinology*, **93**, 45-55, doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.04.004.
- Jaric I., Rocks, D., Cham, H., Herchek, A., and Kundakovic, M. (2019) Sex and estrous cycle effects on anxiety- and depression-related phenotypes in a two-hit developmental stress model, *Front. Mol. Neurosci.*, **12**, 74, doi: 10.3389/fnmol.2019.00074.
- Koss, K. J., and Gunnar, M. R. (2018) Annual research review: early adversity, the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis, and child psychopathology, *J. Child Psychol. Psychiatry*, **59**, 327-346, doi: 10.1111/jcpp.12784.
- Dinel, A.-L., Joffre, C., Trifilieff, P., Aubert, A., Foury, A., Le Ruyet, P., and Layé, S. (2014) Inflammation early in life is a vulnerability factor for emotional behavior at adolescence and for lipopolysaccharide-induced spatial memory and neurogenesis alteration at adulthood, *J. Neuroinflammation*, **11**, 155, doi: 10.1186/s12974-014-0155-x.
- Doenni, V. M., Song, C. M., Hill, M. N., and Pittman, Q. J. (2017) Early-life inflammation with LPS delays fear extinction in adult rodents, *Brain. Behav. Immun.*, **63**, 176-185, doi: 10.1016/j.bbi.2016.11.022.
- Lei, Y., Chen, C.-J., Yan, X.-X., Li, Z., and Deng, X.-H. (2017) Early-life lipopolysaccharide exposure potentiates forebrain expression of NLRP3 inflammasome proteins and anxiety-like behavior in adolescent rats, *Brain Res.*, **1671**, 43-54, doi: 10.1016/j.brainres.2017.06.014.
- Trofimov, A., Strekalova, T., Mortimer, N., Zubareva, O., Schwarz, A., et al. (2017) Postnatal LPS challenge impacts escape learning and expression of plasticity factors Mmp9 and Timp1 in rats: effects of repeated training, *Neurotox. Res.*, **32**, 175-186, doi: 10.1007/s12640-017-9720-2.
- Trofimov, A. N., Rotov, A. Y., Veniaminova, E. A., Fomalont, K., Schwarz, A. P., and Zubareva, O. E. (2020) Changes in behavior and the expression of ionotropic glutamate receptor genes in the brains of adult rats after neonatal administration of bacterial lipopolysaccharide, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **50**, 1239-1248, doi: 10.1007/s11055-020-01025-7.
- Zubareva, O. E., Postnikova, T. Y., Grifluk, A. V., Schwarz, A. P., Smolensky, I. V., et al. (2020) Exposure to bacterial lipopolysaccharide in early life affects the expression of ionotropic glutamate receptor genes and is accompanied by disturbances in long-term potentiation and cognitive functions in young rats, *Brain. Behav. Immun.*, **90**, 3-15, doi: 10.1016/j.bbi.2020.07.034.
- Walker, A. K., Nakamura, T., Byrne, R. J., Naicker, S., Tynan, R. J., et al. (2009) Neonatal lipopolysaccharide and adult stress exposure predisposes rats to anxiety-like behaviour and blunted corticosterone responses: implications for the double-hit hypothesis, *Psychoneuroendocrinology*, **34**, 1515-1525, doi: 10.1016/j.psyneuen.2009.05.010.
- Walker, A. K., Nakamura, T., and Hodgson, D. M. (2010) Neonatal lipopolysaccharide exposure alters central cytokine responses to stress in adulthood in Wistar rats, *Stress*, **13**, 506-515, doi: 10.3109/10253890.2010.489977.
- Harré, E.-M., Galic, M. A., Mouihate, A., Noorbakhsh, F., and Pittman, Q. J. (2008) Neonatal inflammation produces selective behavioural deficits and alters N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNA in the adult rat brain, *Eur. J. Neurosci.*, **27**, 644-653, doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06031.x.
- Hansen, K. B., Yi, F., Perszyk, R. E., Furukawa, H., Wollmuth, L. P., et al. (2018) Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors, *J. Gen. Physiol.*, **150**, 1081-1105, doi: 10.1085/jgp.201812032.
- Liu, S., Lau, L., Wei, J., Zhu, D., Zou, S., et al. (2004) Expression of Ca<sup>2+</sup>-permeable AMPA receptor channels primes cell death in transient forebrain ischemia, *Neuron*, **43**, 43-55, doi: 10.1016/j.neuron.2004.06.017.
- Wenzel, A., Fritschy, J. M., Mohler, H., and Benke, D. (1997) NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins, *J. Neurochem.*, **68**, 469-478, doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.68020469.x.
- Babb, T. L., Mikuni, N., Najm, I., Wylie, C., Olive, M., et al. (2005) Pre- and postnatal expressions of NMDA receptors 1 and 2B subunit proteins in the normal rat cortex, *Epilepsy Res.*, **64**, 23-30, doi: 10.1016/j.eplepsyres.2005.02.008.
- Du Bois, T. M., and Huang, X.-F. (2007) Early brain development disruption from NMDA receptor hypofunction:

- relevance to schizophrenia, *Brain Res. Rev.*, **53**, 260-270, doi: 10.1016/j.brainresrev.2006.09.001.
20. Lippman-Bell, J. J., Zhou, C., Sun, H., Feske, J. S., and Jensen, F. E. (2016) Early-life seizures alter synaptic calcium-permeable AMPA receptor function and plasticity, *Mol. Cell. Neurosci.*, **76**, 11-20, doi: 10.1016/j.mcn.2016.08.002.
  21. Yuan, T., and Bellone, C. (2013) Glutamatergic receptors at developing synapses: the role of GluN3A-containing NMDA receptors and GluA2-lacking AMPA receptors, *Eur. J. Pharmacol.*, **719**, 107-111, doi: 10.1016/j.ejphar.2013.04.056.
  22. Sweatt, J. D. (2016) Neural plasticity and behavior – sixty years of conceptual advances, *J. Neurochem.*, **139 Suppl**, 179-199, doi: 10.1111/jnc.13580.
  23. Diering, G. H., and Huganir, R. L. (2018) The AMPA receptor code of synaptic plasticity, *Neuron*, **100**, 314-329, doi: 10.1016/j.neuron.2018.10.018.
  24. Lisman, J. (2017) Glutamatergic synapses are structurally and biochemically complex because of multiple plasticity processes: long-term potentiation, long-term depression, short-term potentiation and scaling, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **372**, doi: 10.1098/rstb.2016.0260.
  25. Sarantis, K., Antoniou, K., Matsokis, N., and Angelatos, F. (2012) Exposure to novel environment is characterized by an interaction of D1/NMDA receptors underlined by phosphorylation of the NMDA and AMPA receptor subunits and activation of ERK1/2 signaling, leading to epigenetic changes and gene expression in rat hippocampus, *Neurochem. Int.*, **60**, 55-67, doi: 10.1016/j.neuint.2011.10.018.
  26. Barkus, C., McHugh, S. B., Sprengel, R., Seeburg, P. H., Rawlins, J. N. P., and Bannerman, D. M. (2010) Hippocampal NMDA receptors and anxiety: at the interface between cognition and emotion, *Eur. J. Pharmacol.*, **626**, 49-56, doi: 10.1016/j.ejphar.2009.10.014.
  27. Pacheco, A., Aguayo, F. I., Aliaga, E., Muñoz, M., García-Rojo, G., et al. (2017) Chronic stress triggers expression of immediate early genes and differentially affects the expression of AMPA and NMDA subunits in dorsal and ventral hippocampus of rats, *Front. Mol. Neurosci.*, **10**, 244, doi: 10.3389/fnmol.2017.00244.
  28. Costa-Nunes, J., Zubareva, O., Araújo-Correia, M., Valença, A., Schroeter, C. A., et al. (2014) Altered emotionality, hippocampus-dependent performance and expression of NMDA receptor subunit mRNAs in chronically stressed mice, *Stress*, **17**, 108-116, doi: 10.3109/10253890.2013.872619.
  29. Furini, C., Myskiw, J., and Izquierdo, I. (2014) The learning of fear extinction, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **47**, 670-683, doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.10.016.
  30. Matsumoto, Y., Morinobu, S., Yamamoto, S., Matsumoto, T., Takei, S., et al. (2013) Vorinostat ameliorates impaired fear extinction possibly via the hippocampal NMDA-CaMKII pathway in an animal model of posttraumatic stress disorder, *Psychopharmacology (Berlin)*, **229**, 51-62, doi: 10.1007/s00213-013-3078-9.
  31. Réus, G. Z., Abelaira, H. M., Stringari, R. B., Fries, G. R., Kapczinski, F., and Quevedo, J. (2012) Memantine treatment reverses anhedonia, normalizes corticosterone levels and increases BDNF levels in the prefrontal cortex induced by chronic mild stress in rats, *Metab. Brain Dis.*, **27**, 175-182, doi: 10.1007/s11011-012-9281-2.
  32. Padovan, C. M., and Guimarães, F. S. (2004) Antidepressant-like effects of NMDA-receptor antagonist injected into the dorsal hippocampus of rats, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **77**, 15-19, doi: 10.1016/j.pbb.2003.09.015.
  33. Blacker, C. J., Millischer, V., Webb, L. M., Ho, A. M. C., Schalling, M., et al. (2020) EAAT2 as a research target in bipolar disorder and unipolar depression: a systematic review, *Mol. Neuropsychiatry*, **5**, 44-59, doi: 10.1159/000501885.
  34. Zink, M., Vollmayr, B., Gebicke-Haerter, P. J., and Henn, F. A. (2010) Reduced expression of glutamate transporters vGluT1, EAAT2 and EAAT4 in learned helpless rats, an animal model of depression, *Neuropharmacology*, **58**, 465-473, doi: 10.1016/j.neuropharm.2009.09.005.
  35. Zhang, X. H., Jia, N., Zhao, X. Y., Tang, G. K., Guan, L. X., et al. (2013) Involvement of pGluR1, EAAT2 and EAAT3 in offspring depression induced by prenatal stress, *Neuroscience*, **250**, 333-341, doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.04.031.
  36. Kovalenko, A. A., Zakharova, M. V., Nikitina, V. A., Schwarz, A. P., Karyakin, V. B., et al. (2018) Alterations in the expression of genes that encode subunits of ionotropic glutamate receptors and the glutamate transporter in brain structures of rats after psychogenic stress, *Neurochem. J.*, **12**, 135-141, doi: 10.1134/S181971241802006X.
  37. Nasca, C., Bigio, B., Zelli, D., de Angelis, P., Lau, T., et al. (2017) Role of the Astroglial glutamate exchanger xCT in ventral hippocampus in resilience to stress, *Neuron*, **96**, 402-413.e5, doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.020.
  38. Beznin, G. V., Pshenichnaya, A. G., Kusov, A. G., and Tsikunov, S. G. (2012) Morphological and functional bases of behavioral deviations in the model of acute vital stress in rats, *Med. Akadem. Zhurn.*, **12**, 37-39.
  39. Paxinos, G., and Watson, C. (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 6th Edition, Academic Press.
  40. Kopec, A. M., Rivera, P. D., Lacagnina, M. J., Hanamsagar, R., and Bilbo, S. D. (2017) Optimized solubilization of TRIzol-precipitated protein permits Western blotting analysis to maximize data available from brain tissue, *J. Neurosci. Methods*, **280**, 64-76, doi: 10.1016/j.jneumeth.2017.02.002.
  41. Harrington, C. R. (1990) Lowry protein assay containing sodium dodecyl sulfate in microtiter plates for protein determinations on fractions from brain tissue, *Anal. Biochem.*, **186**, 285-7, doi: 10.1016/0003-2697(90)90081-j.
  42. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
  43. Lei, T., Dong, D., Song, M., Sun, Y., Liu, X., and Zhao, H. (2020) Risperidone treatment in the lateral habenula improves despair-like behavior in mice, *Neuropsychopharmacology*, **45**, 1717-1724, doi: 10.1038/s41386-020-0652-9.
  44. Delawary, M., Tezuka, T., Kiyama, Y., Yokoyama, K., Inoue, T., et al. (2010) NMDAR2B tyrosine phosphorylation regulates anxiety-like behavior and CRF expression in the amygdala, *Mol. Brain*, **3**, 37, doi: 10.1186/1756-6606-3-37.
  45. Rahman, T., Zavitsanou, K., Purves-Tyson, T., Harms, L. R., Meehan, C., et al. (2017) Effects of immune activation during early or late gestation on N-methyl-D-aspartate receptor measures in adult rat offspring, *Front. Psychiatry*, **8**, 77, doi: 10.3389/fpsy.2017.00077.
  46. Tishkina, A., Stepanichev, M., Kudryashova, I., Freiman, S., Onufriev, M., et al. (2016) Neonatal proinflammatory challenge in male Wistar rats: effects on behavior, synaptic plasticity, and adrenocortical stress response, *Behav. Brain Res.*, **304**, 1-10, doi: 10.1016/j.bbr.2016.02.001.
  47. Onufriev, M. V., Freiman, S. V., Peregud, D. I., Kudryashova, I. V., Tishkina, A. O., et al. (2017) Neonatal proinflammatory stress induces accumulation of corticosterone and interleukin-6 in the hippocampus of juvenile rats: potential mechanism of synaptic plasticity impairments, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 275-281, doi: 10.1134/S0006297917030051.
  48. Postnikova, T. Y., Griflyuk, A. V., Ergina, J. L., Zubareva, O. E., and Zaitsev, A. V. (2020) Administration of bacterial lipopolysaccharide during early postnatal ontogenesis induces transient impairment of long-term synaptic plasticity associated with behavioral abnormalities in young rats, *Pharmaceuticals (Basel)*, **13**, doi: 10.3390/ph13030048.

49. Onufriev, M. V., Uzakov, S. S., Freiman, S. V., Stepanichev, M. Y., Moiseeva, Y. V., et al. (2018) The Dorsal and ventral hippocampus have different reactivities to proinflammatory stress: corticosterone levels, cytokine expression, and synaptic plasticity, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **48**, 1024-1031, doi: 10.1007/s11055-018-0665-6.
50. Benmhammed, H., El Hayek, S., Nassiri, A., Bousalham, R., Mesfioui, A., et al. (2019) Effects of lipopolysaccharide administration and maternal deprivation on anxiety and depressive symptoms in male and female Wistar rats: Neurobehavioral and biochemical assessments, *Behav. Brain Res.*, **362**, 46-55, doi: 10.1016/j.bbr.2019.01.005.
51. Sulakhiya, K., Keshavlal, G. P., Bezbaruah, B. B., Dwivedi, S., Gurjar, S. S., et al. (2016) Lipopolysaccharide induced anxiety- and depressive-like behaviour in mice are prevented by chronic pre-treatment of esculetin, *Neurosci. Lett.*, **611**, 106-111, doi: 10.1016/j.neulet.2015.11.031.
52. Walker, F. R., March, J., and Hodgson, D. M. (2004) Endotoxin exposure in early life alters the development of anxiety-like behaviour in the Fischer 344 rat, *Behav. Brain Res.*, **154**, 63-69, doi: 10.1016/j.bbr.2004.01.019.
53. Spencer, S. J., Heida, J. G., and Pittman, Q. J. (2005) Early life immune challenge – effects on behavioural indices of adult rat fear and anxiety, *Behav. Brain Res.*, **164**, 231-238, doi: 10.1016/j.bbr.2005.06.032.
54. Custódio, C. S., Mello, B. S. F., Filho, A. J. M. C., de Carvalho Lima, C. N., Cordeiro, R. C., et al. (2018) Neonatal immune challenge with lipopolysaccharide triggers long-lasting sex- and age-related behavioral and immune/neurotrophic alterations in mice: relevance to autism spectrum disorders, *Mol. Neurobiol.*, **55**, 3775-3788, doi: 10.1007/s12035-017-0616-1.
55. Fan, L.-W., Tien, L.-T., Mitchell, H. J., Rhodes, P. G., and Cai, Z. (2008) Alpha-phenyl-n-tert-butyl-nitron ameliorates hippocampal injury and improves learning and memory in juvenile rats following neonatal exposure to lipopolysaccharide, *Eur. J. Neurosci.*, **27**, 1475-1484, doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06121.x.
56. Zoladz, P. R., and Diamond, D. M. (2016) Predator-based psychosocial stress animal model of PTSD: preclinical assessment of traumatic stress at cognitive, hormonal, pharmacological, cardiovascular and epigenetic levels of analysis, *Exp. Neurol.*, **284**, 211-219, doi: 10.1016/j.expneurol.2016.06.003.
57. Zoladz, P. R., Park, C. R., Fleshner, M., and Diamond, D. M. (2015) Psychosocial predator-based animal model of PTSD produces physiological and behavioral sequelae and a traumatic memory four months following stress onset, *Physiol. Behav.*, **147**, 183-192, doi: 10.1016/j.physbeh.2015.04.032.
58. Auxéméry, Y. (2012) Posttraumatic stress disorder (PTSD) as a consequence of the interaction between an individual genetic susceptibility, a traumatogenic event and a social context, *Encephale*, **38**, 373-380, doi: 10.1016/j.encep.2011.12.003.
59. Ding, X.-F., Li, Y.-H., Chen, J.-X., Sun, L.-J., Jiao, H.-Y., et al. (2017) Involvement of the glutamate/glutamine cycle and glutamate transporter GLT-1 in antidepressant-like effects of Xiao Yao san on chronically stressed mice, *BMC Complement. Altern. Med.*, **17**, 326, doi: 10.1186/s12906-017-1830-0.
60. Shanks, N., Larocque, S., and Meaney, M. J. (1995) Neonatal endotoxin exposure alters the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: early illness and later responsiveness to stress, *J. Neurosci.*, **15**, 376-384.
61. Zoladz, P. R., Fleshner, M., and Diamond, D. M. (2012) Psychosocial animal model of PTSD produces a long-lasting traumatic memory, an increase in general anxiety and PTSD-like glucocorticoid abnormalities, *Psychoneuroendocrinology*, **37**, 1531-1545, doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.02.007.
62. Olf, M., Güzelcan, Y., de Vries, G.-J., Assies, J., and Gersons, B. P. R. (2006) HPA- and HPT-axis alterations in chronic posttraumatic stress disorder, *Psychoneuroendocrinology*, **31**, 1220-1230, doi: 10.1016/j.psyneuen.2006.09.003.

## NEONATAL EXPOSURE TO BACTERIAL LIPOPOLYSACCHARIDE ALTERS BEHAVIOR AND HIPPOCAMPAL IONOTROPIC GLUTAMATE RECEPTOR EXPRESSION IN THE ADULT RATS AFTER PSYCHOGENIC TRAUMA

V. A. Nikitina<sup>1</sup>, M. V. Zakharova<sup>2</sup>, A. N. Trofimov<sup>1</sup>, A. P. Schwarz<sup>2</sup>,  
G. V. Beznin<sup>1</sup>, S. G. Tsikunov<sup>1</sup>, and O. E. Zubareva<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Institute of Experimental Medicine, 197376 Saint Petersburg, Russia

<sup>2</sup> Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, 194223 Saint Petersburg, Russia; E-mail: zubarevae@mail.ru

According to the “two-hit hypothesis” of formation of psychoneuropathology, infectious diseases and other pathological conditions during critical periods of early ontogenesis disrupt the normal development of the brain, increasing its vulnerability to stresses experienced in the adolescence and adulthood. It is assumed that these disorders may be associated with changes in the functional activity of the hippocampal glutamatergic system. In the present work, we studied the protein level of gene expression of NMDA (GluN1, GluN2a, GluN2b) and AMPA (GluA1, GluA2) glutamate receptor subunits, as well as glutamate transporter EAAT2 in the ventral and dorsal hippocampus of rats which were injected with LPS during the 3rd week of the life and experienced a vital stress (a contact with a predator, a python) in the adulthood. The testing was performed 25 days after the stress. Abnormalities were found in the ventral, but not in the dorsal hippocampus. Non-stressed LPS-treated rats had a lower level of GluN2b protein in the ventral hippocampus as compared to the control animals, while after the stress the level of GluN2b was significantly increased in the LPS-treated, but not in the control animals. Different responses to stress in the experimental and control rats were also revealed in terms of the exploratory behavior: when compared with non-stressed animals, the stressed control rats demonstrated a higher locomotor activity in the 1<sup>st</sup> min of the “Open Field” test, while this parameter was lower in the stressed experimental rats. In addition, the stressed and non-stressed rats which were injected with LPS in the early age spent a longer time in the open arms when tested in the “Elevated Plus Maze” and had a reduced blood level of corticosterone. To summarize, our study shows that exposure to bacterial LPS in the early postnatal ontogenesis affects the pattern of stress-induced changes in the behavior and expression of genes encoding subunits of ionotropic glutamate receptors in the hippocampus after a psychogenic trauma suffered in the adulthood.

**Keywords:** lipopolysaccharide, early development, brain, stress reactivity, NMDA receptor, AMPA receptor, behavior

## ПОВРЕЖДЕНИЕ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА ПРИ СТРЕССЕ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ: БИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ И НОВЫЕ МОДЕЛИ ДЛЯ ТРАНСЛЯЦИОННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Обзор

© 2021 А.Б. Салмина<sup>1,2\*</sup>, Ю.К. Комлева<sup>2</sup>, Н.А. Малиновская<sup>2</sup>, А.В. Моргун<sup>2</sup>,  
Е.А. Тепляшина<sup>2</sup>, О.Л. Лопатина<sup>2</sup>, Я.В. Горина<sup>2</sup>,  
Е.В. Харитонов<sup>2</sup>, Е.Д. Хилажева<sup>2</sup>, А.Н. Шуваев<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Отдел исследований мозга, ФГБНУ «Научный центр неврологии», 125367 Москва, Россия

<sup>2</sup> НИИ молекулярной медицины и патобиохимии, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, 660022 Красноярск, Россия; электронная почта: allasalmina@mail.ru

Поступила в редакцию 16.02.2021

После доработки 31.03.2021

Принята к публикации 23.04.2021

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является структурно-функциональным элементом нейроваскулярной единицы (НВЕ), включающей в себя клетки нейрональной, глиальной и эндотелиальной природы. В числе основных задач функционирования НВЕ – поддержание контроля метаболизма и химического гомеостаза в ткани головного мозга, обеспечение адекватного кровотока в активных регионах, регуляция процессов нейропластичности, что находит свое отражение в реализации сложного комплекса межклеточных взаимодействий. Современные варианты моделей ГЭБ и НВЕ, статические и динамические, существенно расширили исследовательские возможности, однако ряд вопросов, в частности персонификация модели, остается не решенным. Кроме того, применение любых моделей связано со сложностью в воспроизведении патологических механизмов, обуславливающих нарушение целостности барьера при заболеваниях центральной нервной системы. В обзоре рассмотрены современные представления о клеточно-молекулярных механизмах и метаболических процессах, контролирующих проницаемость ГЭБ, а также патобиохимические механизмы и проявления повреждения ГЭБ при стрессе и нейродегенеративных заболеваниях, включая проблемы и перспективы создания *in vitro* моделей ГЭБ и НВЕ для трансляционных исследований в неврологии и нейрофармакологии. Работы в области изучения ГЭБ формируют новые возможности для развития смежных направлений – регенеративной медицины, нейрофармакологии и нейрореабилитации.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** головной мозг, гематоэнцефалический барьер, стресс, нейродегенерация.

**DOI:** 10.31857/S0320972521060130

### ВВЕДЕНИЕ

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является структурно-функциональным элементом нейроваскулярной единицы (НВЕ), включающей в себя клетки нейрональной, глиальной и эндотелиальной природы. В число основных задач функционирования НВЕ входит поддержание контроля метаболизма и химического гомео-

стаза в ткани головного мозга, обеспечение адекватного кровотока в активных регионах, регуляция процессов нейропластичности, что находит свое отражение в реализации сложного комплекса межклеточных взаимодействий в норме, при стрессе, нейродегенерации, нейроинфекции, нарушениях развития головного мозга [1–5].

Селективная транселлюлярная и параселлюлярная проницаемость ГЭБ становится препятствием для использования многих препаратов с нейротропной активностью: значительная часть лекарственных средств и/или их носителей не достигают своих мишеней в клетках головного мозга, что создает серьезную проблему для лечения психических, неврологических, онкологических заболеваний. Кроме того, патоло-

Принятые сокращения: ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; НВЕ – нейроваскулярная единица; iPSC – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ЦНС – центральная нервная система; А $\beta$  – бета-амилоид; APP – предшественник бета-амилоида; P-gp – P-гликопротеин; TEER – трансэндотелиальное электрическое сопротивление (transendothelial electric resistance).

\* Адресат для корреспонденции.

гически повышенная неконтролируемая проницаемость ГЭБ характерна практически для всех видов патологии центральной нервной системы (ЦНС), что способствует развитию альтерации ткани (например, вследствие отека головного мозга, геморрагических осложнений) и неврологического дефицита [1–3]. Следует отметить, что изучение клеточно-молекулярных механизмов повреждения и восстановления НВЕ и ГЭБ является большим самостоятельным направлением в современных экспериментальных и клинических нейронауках, прогресс которого во многом определяется качеством реконструируемых *in vitro* моделей ГЭБ и НВЕ.

Для исследования механизмов функционирования НВЕ и ГЭБ, оценки проницаемости лекарств-кандидатов и носителей через ГЭБ, разработки новых методов управления проницаемостью барьера применяют разнообразные модели *in vitro*. Модели ГЭБ *in vitro* могут быть созданы из разных типов клеток (например, церебральный эндотелий, перициты, астроглия) человеческого и животного происхождения. Обычно для «сборки» модели *in vitro* используют клетки эндотелия сосудов, но при этом необходимо принимать во внимание существенные отличия в проницаемости и метаболизме клеток церебрального эндотелия от клеток эндотелия сосудов других тканей. В частности, среди этих различий следует упомянуть высокий уровень митохондриальной активности, уникальный экспрессионный профиль, низкий уровень фенестрации клеток церебрального эндотелия, поэтому предпочтительным является применение клеток эндотелия микрососудов головного мозга [4, 5]. Использование в составе модели клеток других типов опционально, например, валидированы модели, включающие эндотелий, перициты и астроглию, либо эндотелий, астроциты и нейроны [6, 7]. Статические варианты моделей включают:

- 1) transwell-модели, где эндотелиоциты располагаются на полупроницаемой мембране, как правило, дистанцированной от остальных клеток;
- 2) модели с клетками в составе аналога внеклеточного матрикса, например, в гидрогеле;
- 3) сфероидные модели, «собранные» по принципу самоорганизации (смешивание эндотелиоцитов, перицитов и астроглии в культуре при определенных условиях обеспечивает формирование сфероидов с эндотелиоцитами, располагающимися по периферии конгломерата) [8, 9].

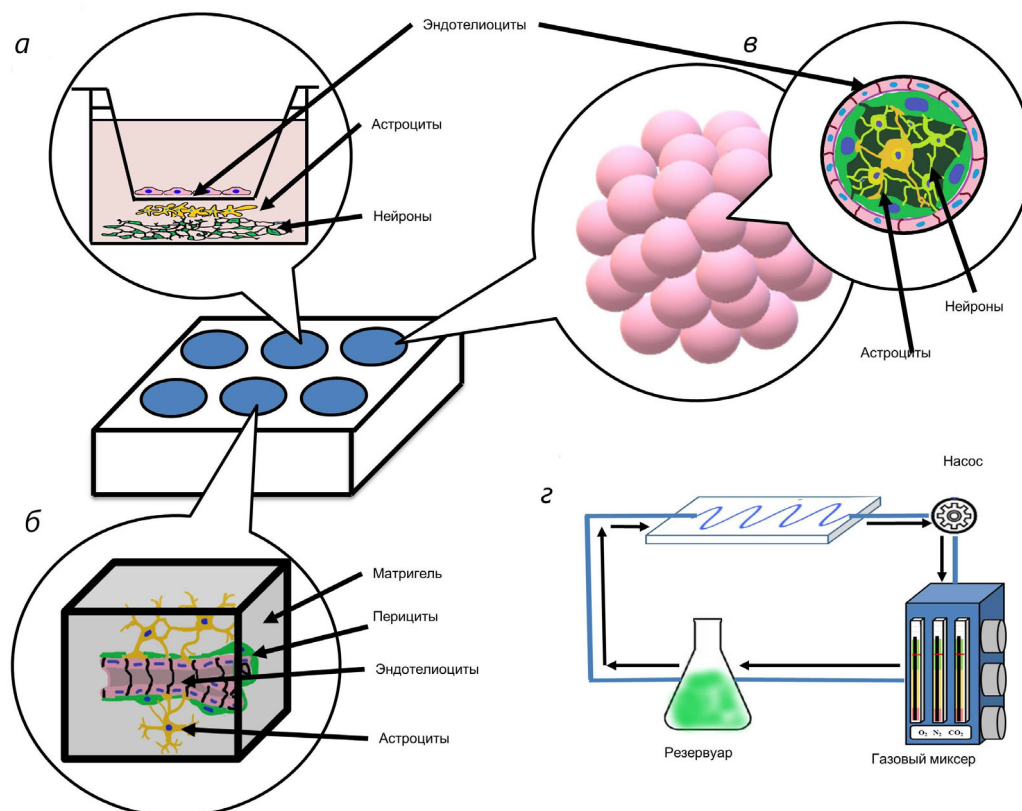
Динамические (микротоковые) модели ГЭБ являются очень разнообразными, что определяется микроархитектурой чипа и материалом, из которого он изготовлен [10]. Схематическое изображение всех перечисленных форматов *in vitro* моделей ГЭБ представлено на рис. 1.

Критическим фактором, определяющим возможности формирования модели ГЭБ *in vitro*, является достижение клетками эндотелия свойств, характерных для эндотелиоцитов церебральных микрососудов; даже полученные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) церебральные эндотелиоциты не обладают экспрессионным профилем, характерным для реального церебрального эндотелия в составе ГЭБ [11]. Это, фактически, является препятствием для создания полноценных персонифицированных моделей ГЭБ, сформированных из клеток-потомков иПСК. Различия структурных и функциональных параметров клеток эндотелия, полученных из иПСК разных людей, существенно снижают информативность такой модели, в частности в контексте оценки индивидуальной чувствительности к действию фармакологических препаратов. Кроме того, оценка и (при возможности) коррекция метаболического статуса и экспрессионного профиля клеток-компонентов ГЭБ важны для достижения функциональной компетентности клеток в составе *in vitro* модели, применения технологий направленного открытия барьера или подавления его патологической проницаемости при стрессе и нейродегенерации [9, 11].

Современные варианты моделей ГЭБ и НВЕ, статические и динамические, существенно расширили исследовательские возможности, однако ряд вопросов остается нерешенным, в частности, как было указано выше, персонификация моделей для конкретного пациента. Кроме того, в применении и статических, и динамических моделей существует важная проблема, связанная со сложностью в воспроизведении патофизиологических и биохимических механизмов, обуславливающих нарушение структурно-функциональной целостности барьера при заболеваниях ЦНС, в результате чего тестирование лекарств-кандидатов на «здоровых» моделях может дать результаты, не соответствующие ситуации с патологически измененным барьером. Преодоление этой проблемы возможно только за счет использования новых знаний о клеточно-молекулярных механизмах повреждения ГЭБ и НВЕ при патологии.

### **СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О КЛЕТЧНО-МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМАХ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ ПРОНИЦАЕМОСТЬ ГЭБ**

Селективная и контролируемая проницаемость ГЭБ *in vivo* обеспечивается тесным функциональным сопряжением нескольких видов



**Рис. 1.** Модели гематоэнцефалического барьера *in vitro*: *a* – модели на культуральных вставках (полупроницаемые мембраны); *б* – модели с использованием гидрогеля/матригеля; *в* – сфероидная самоорганизующаяся модель; *г* – микрофлюидная модель

клеток. Клетки эндотелия микрососудов головного мозга формируют монослой и, экспрессируя большое число транспортеров и каналов, имеют возможность регулировать перенос химических соединений. Кроме того, межклеточные контакты могут в определенных условиях выступать в качестве пути для пассажа клеток периферической крови в ткань головного мозга. Перicyты, окружающие эндотелий, поддерживают (метаболически, секреторно) функциональную активность эндотелиоцитов, а также участвуют в формировании ГЭБ. Периваскулярная астроглия, контактирующая с базальной мембраной клеток эндотелия, регулирует структурную целостность и метаболическую активность монослоя эндотелиоцитов. Кроме того, другие клетки-компоненты НВЕ (нейроны, олигодендроциты, микроглия) оказывают влияние на проницаемость барьера [4].

В целом, результаты экспериментальных и клинических исследований последних двух десятилетий убедительно демонстрируют, что основными факторами, определяющими проницаемость ГЭБ, являются:

1) экспрессия белков межклеточных контактов: плотных (например, клаудины, окклюди-

ны) и адгезионных (например, JAM, ZO-1), ответственных за парацеллюлярную проницаемость;

2) экспрессия белков-транспортеров и каналов (например, монокарбоксилатные транспортеры, транспортеры глюкозы, Р-гликопротеин (P-gp), RAGE-рецепторы, LRP), реализующих трансцеллюлярную проницаемость;

3) структурно-функциональная целостность церебральных эндотелиоцитов (метаболический статус, в том числе сохранность функции митохондрий, которыми чрезвычайно богаты эти клетки), а также экспрессия в них белков-компонентов клеточных сигнальных путей (рецепторы, G-белки, ферменты, транскрипционные факторы);

4) широкий спектр межклеточных взаимодействий (астроцит-эндотелиальных, перicyт-эндотелиальных), продукция и действие цитокинов, нейро- и глиотрансмиттеров, факторов роста;

5) состояние базальной мембраны, состоящей из белков внеклеточного матрикса, которая окружает слой эндотелиоцитов и обладает своеобразной микроархитектурой и порозностью;

6) степень зрелости ГЭБ [12–15].

Парацеллюлярная проницаемость ГЭБ *in vivo* минимальна в физиологических условиях, в результате чего т.н. трансэндотелиальное электрическое сопротивление (transendothelial electric resistance, TEER) может достигать 1500–2000 Ом/см<sup>2</sup> [16] и даже 8000 Ом/см<sup>2</sup> [17]. К сожалению, в условиях *in vitro* моделей ГЭБ достижение таких значений практически невозможно, поэтому для исследовательских целей достаточным считается сопротивление порядка 150–200 Ом/см<sup>2</sup> [4, 6]. В основе механизмов поддержания минимальной парацеллюлярной проницаемости лежит экспрессия белков плотных и адгезионных контактов. Плотные контакты (tight junctions, TJs) сформированы в участках контакта клеток церебрального эндотелия из белков семейства клаудинов (CLDN) и окклюдина (OCLN), обладающих способностью взаимодействовать с аналогичными белками контактирующих клеток, что обеспечивает естественную (механическую) преграду для пассажа молекул и клеток [18]. Вторым важным компонентом регуляторного механизма парацеллюлярной проницаемости являются адгезионные контакты (adherens junctions, AJs), сформированные белками клеточной адгезии – ZO-1, JAM-белками суперсемейства иммуноглобулинов, кадгеринами [16]. Одной из важных функций белков адгезионных контактов является образование внутриклеточных мультибелковых платформ (скаффолдов), что важно для скоординированного ответа эндотелиальных клеток на действие факторов, способных привести к нарушению структурно-функциональной целостности барьера (механических воздействий, активированных лейкоцитов или бактериальных агентов). В этой связи интересной представляется роль скаффолд-образующего белка ZO-1, который координирует межмолекулярные взаимодействия трансмембранных и цитозольных белков, в частности окклюдина, клаудинов и белков цитоскелета, а также коннексинов [16, 19]. Важно отметить, что экспрессия белков плотных контактов весьма чувствительна к действию разнообразных по природе повреждающих факторов: например, депривация кислорода и глюкозы или даже обычная смена питательной среды в условиях культивирования клеток церебрального эндотелия *in vitro* вызывают увеличение парацеллюлярной проницаемости, сопровождающееся снижением экспрессии CLDN1, CLDN5, ZO-1, окклюдина [20]. Насколько это может влиять на воспроизводимость результатов, полученных с использованием *in vitro* моделей ГЭБ и НВЕ, остается не выясненным.

Примечательно, что наименее изученной, как ни парадоксально, в контексте регуляции

парацеллюлярной проницаемости ГЭБ является роль коннексинов (Cx), формирующих межклеточные каналы – коннексоны, или щелевые контакты (gap junctions, GJs). Коннексоны участвуют в пассаже достаточно крупных молекул (НАД<sup>+</sup>, АТФ, лактат) и ионов (кальций), а также быстро реагируют на изменения метаболизма клеток [5]. Еще сравнительно недавно экспрессия Cx в головном мозге считалась prerогативой астроцитов, которые используют коннексоны для формирования астроглиального синцития [5], микроокружения в нейрогенных нишах головного мозга или для взаимодействия астроцитов с олигодендроглией [21], однако новые данные указывают на то, что коннексыны не менее актуальны для взаимодействия клеток эндотелия в пределах ГЭБ, причем они могут оказывать и негативное влияние на целостность барьера: подавление активности Cx43 способно снижать патологически повышенную проницаемость ГЭБ [22]. Показано, что подавление межклеточной коммуникации при участии Cx43 является результатом гипоксически-ишемического повреждения астроцитов, что сопровождается активацией полуканалов Cx43, высвобождающих лактат, НАД<sup>+</sup>, АТФ во внеклеточное пространство, способствуя тем самым паракринной и аутокринной сигнализации в ткани [23], поэтому логично предположить, что аналогичные события в клетках эндотелия могут приводить к увеличению пассивной парацеллюлярной проницаемости ГЭБ.

Молекулы тромбоцитарно-эндотелиальной клеточной адгезии (PECAM-1, или CD31) участвуют в контроле парацеллюлярной проницаемости ГЭБ, однако они локализованы вне мультибелкового комплекса плотных и адгезионных контактов. CD31 является несубстратным лигандом лейкоцитарного CD38, трансмембранного гликопротеина, конвертирующего НАД<sup>+</sup> в циклическую ADP-рибозу, индуцирующую мобилизацию кальция из внутриклеточных кальциевых депо в цитозоль [24, 25], что является необходимым для реализации клеточных механизмов адгезии активированных лейкоцитов к эндотелию. CD31 также участвует в регуляции ремоделирования сосудов и ангиогенеза, может выступать в качестве молекулы-механосенсора, при этом недостаточность его экспрессии в клетках эндотелия церебральных микрососудов ассоциирована с повышенной проницаемостью ГЭБ, например, при нейровоспалении [13].

Наиболее распространенным методом оценки парацеллюлярной проницаемости ГЭБ *in vivo* является инфузия в кровь молекул, проникновение которых между клетками церебрального эндотелия лимитировано размером. Например, от-



рицательно заряженная гидрофильная молекула флуоресцеина натрия (0,365 кДа) может проникать через ГЭБ парацеллюлярно, поэтому накопление этого зонда в ткани мозга свидетельствует о минимальном повреждении плотных или адгезионных контактов. При более выраженном повреждении целостности эндотелиального слоя в ткань из крови начинают проникать молекулы красителя Эванса синего (Evans blue), связанного с альбумином (69 кДа), или высокомолекулярные декстраны (10–70 кДа) [26, 27].

В последние годы появились новые методы, позволяющие регистрировать парацеллюлярную проницаемость ГЭБ у животных и человека *in vivo*:

1) инфракрасная спектроскопия (NIRS, near-infrared spectroscopy) с индоцианином зеленым, обладающим быстрым клиренсом из ткани, например, для оценки состояния ГЭБ у пациентов с травмой головного мозга; NIRS обеспечивает возможность проведения перманентного нейромониторинга и последовательной регистрации перфузии головного мозга и проницаемости ГЭБ [28];

2) магнитно-резонансная томография (МРТ) высокого разрешения с контрастированием: накопление контрастного агента на основе гадолиния (гадопентенат димеглюмина, гадолиамид, гадотерат меглюмина, гадобутрол, гадотеридол) во внеклеточном периваскулярном пространстве приводит к увеличению времени продольной релаксации и интенсивности сигнала на T1-взвешенных изображениях, однако результаты применения таких протоколов, как правило, трудно сопоставимы ввиду различий в методиках анализа изображений [29, 30];

3) позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) с радиолигандами (например, с 2-амино-<sup>3</sup>C-изобутиратом), позволяющими оценить проницаемость ГЭБ, кинетика накопления которых в периваскулярном пространстве в участках повреждения головного мозга более информативна, чем в случае применения МРТ с контрастированием [31].

Для тестирования парацеллюлярной проницаемости *in vitro* обычно используют измерение ТЕЕР (вольтметрия) либо определение концентрации зондов (например, FITC-декстранов, липосом, наночастиц) по обе стороны барьера. Кроме того, вовлеченность Sx43 в поддержание целостности плотных контактов эндотелиального слоя может быть визуализирована с помощью гидрофильного красителя Люцифера желтого (Lucifer yellow), который может проникать через сформированные Sx43 полуканалы [6]. Примечательно, что сходные методические подходы реализуются и в статических (trans-

well), и в микропотоковых (микрофлюидных) моделях ГЭБ, причем существует достаточно много вариантов регистрации ТЕЕР, например, с использованием интегрированных в микрофлюидные чипы платиновых электродов [32]. В целом, в условиях *in vitro* парацеллюлярная проницаемость является одним из наиболее часто регистрируемых параметров. Отсутствие сформированного *in vitro* монослоя эндотелиоцитов препятствует достижению высоких значений ТЕЕР, является причиной высокой порозности барьера, поэтому в таких условиях изучение механизмов проницаемости барьера становится некорректным.

Следует отметить, что преодоление парацеллюлярного барьера представляет собой одну из задач доставки лекарственных препаратов или диагностических средств в ткань головного мозга (в том числе и в виде неклассических форм, например, наночастиц) [33], тогда как патологически повышенная парацеллюлярная проницаемость ответственна за развитие отека головного мозга и миграцию лейкоцитов в ткань с последующим развитием нейровоспаления [34, 35]. Доставка лекарственных соединений и их носителей может считаться успешной в том случае, если все компоненты барьера преодолены (эндотелий, перициты, базальная мембрана, астроциты), и соединение в неизменном виде поступило во внеклеточное периваскулярное пространство. Для достижения этой цели обычно используются методы обратимого и контролируемого «открытия» барьера, например, ультразвуком или за счет стимуляции рецепторов, обеспечивающих локальную вазодилатацию (например, аденозинных рецепторов) [36, 37]. В этом контексте применение *in vitro* моделей является очень востребованным, так как оно позволяет осуществлять скрининговые исследования новых протоколов и персонифицировать терапевтические подходы в обозримом будущем [38].

С другой стороны, очевидна и доказана роль повреждения белков межклеточных контактов церебральных эндотелиоцитов в патогенезе большого круга нейродегенеративных заболеваний, травмы и ишемии головного мозга [39, 40], а новые данные свидетельствуют о вовлеченности аналогичных механизмов в прогрессирование депрессии и шизофрении [41]. В таком случае возникает необходимость снижения избыточной проницаемости ГЭБ для купирования реакции нейровоспаления либо интенсификации процессов клиренса токсических соединений с использованием функциональных возможностей периваскулярных астроцитов [42].

Трансцеллюлярная проницаемость ГЭБ определяется активностью большого числа кана-

лов и транспортеров, обладающих субстратной специфичностью, а также кавеолин-опосредованных механизмов. Считают, что за счет кавеолина-1 (CAV1), взаимодействующего с белками плотных контактов, трансцеллюлярная и парацеллюлярная проницаемости ГЭБ тесно связаны друг с другом [12]. Например, повышение проницаемости ГЭБ при острой ишемии связывают не столько с разрушением структуры плотных контактов, сколько с усилением эндотелиального кавеолин- и клатрин-зависимого трансцитоза, подразумевающего формирование большого числа эндотелиальных везикул, транспортирующих молекулы через клетку эндотелия в ткань головного мозга или в кровь [43].

Одним из ключевых транспортеров, экспрессирующихся в мембране клеток церебрального эндотелия, является Р-гликопротеин (Р-gp, MDR-белок, продукт экспрессии гена *ABCBI*), функционирующий в качестве экстрюзора для гидрофобных молекул и принадлежащий к семейству АТР-связывающих транспортеров [44]. Избыточная активность Р-gp обеспечивает транспорт из ткани головного мозга в кровь ксенобиотиков, в том числе лекарственных соединений (что может обуславливать формирование мультирезистентности), тогда как недостаточная активность этого транспортера ассоциирована со старением [44]. Интересно, что обеспечение прохождения ряда лекарственных соединений через ГЭБ за счет применения сфокусированного ультразвука подавляет экспрессию Р-gp, что также способствует достижению препаратом молекул-мишеней в клетках ЦНС [45].

Не менее важна роль Р-gp в клетках церебрального эндотелия как транспортера бета-амилоида (А $\beta$ ): постоянно образующийся в ткани головного мозга из предшественника амилоида (APP) А $\beta$  должен быть перемещен в кровь (т.н. клиренс амилоида) во избежание аккумуляции его агрегированных форм и развития нейродегенерации альцгеймеровского типа [46]. Более того, экспериментальные данные последних лет свидетельствуют о том, что APP экспрессируется в эндотелии микрососудов и выполняет ряд физиологических функций (регуляция ангиогенеза, контроль нейрогенеза в обильно васкуляризованных нейрогенных нишах), что, предположительно, характерно и для генерируемого в НВЕ А $\beta$  (проангиогенное действие, восстановление поврежденного эндотелиального слоя) [47]. Таким образом, Р-gp в клетках эндотелия микрососудов головного мозга может выступать и в качестве значимого регулятора биодоступности А $\beta$ , что, в конечном счете, оказывает влияние на процессы ангиогенеза и барьерогенеза.

Клетки церебрального эндотелия экспрессируют широкий спектр (более 300) транспортеров, относящихся к семейству SLC (solute carrier transporter), чье функционирование необходимо для трансфера аминокислот, глюкозы, лактата, ионов, витаминов, жирных кислот [48]. Оценка их экспрессии, а также экспрессии белков плотных контактов и определение уровня TEER является обязательным этапом валидации целостности монослоя эндотелия *in vitro*. Например, такой комплексный подход применяется для подтверждения функциональной компетентности клеток эндотелия церебральных микрососудов, полученных из ИПСК [49]. Экспрессионный профиль SLC в клетках эндотелия микрососудов меняется в процессе развития организма [50], а в условиях *in vitro* он чувствителен даже к изменениям состава питательной среды, в частности, экспрессия SLC2A1, SLC16A1 и SLC7A5 (но не белков плотных контактов) прогрессивно снижается при культивировании по сравнению с их экспрессией в клетках эндотелия, свежесывающихся из капилляров [51]. Эти обстоятельства следует учитывать при моделировании ГЭБ и НВЕ *in vitro*, а также при разработке других моделей, воспроизводящих характерные для разных периодов онтогенеза особенности функционирования барьера. Для оценки трансцеллюлярной проницаемости барьера *in vivo* могут быть применены методы, регистрирующие проницаемость барьера для субстратов тех или иных транспортеров (например, верапамил используется в качестве субстрата для Р-gp). Существуют различные трейсеры (радиолиганды), позволяющие оценить проницаемость ГЭБ для лекарственных препаратов *in vivo* с помощью ПЭТ, а также для решения предиктивных задач в *in vitro* моделях [7, 52, 53]. Кроме того, *in vitro* такая исследовательская задача часто сводится к оценке изменений экспрессии соответствующих белков-транспортеров и концентрации транспортируемых ими метаболитов в разных компартментах модели [54]. В условиях *in vivo* парацеллюлярная и трансцеллюлярная проницаемость может быть достаточно эффективно оценена с помощью протоколов спектральной визуализации, оптической когерентной томографии [55, 56]. Основные механизмы регуляции парацеллюлярной и трансцеллюлярной проницаемости барьера схематично представлены на рисунке 2.

Метаболический статус клеток церебрального эндотелия имеет существенное значение для поддержания целостности ГЭБ. В первую очередь это связано с активной работой митохондрий, количество которых в этом типе эндотелиоцитов больше, чем в эндотелии капилляров дру-

гой локализации [57]. Именно поэтому развитие митохондриальной дисфункции при действии фармакологических ингибиторов работы митохондрий или бактериальных токсинов провоцирует нарушение целостности барьера [58]. Особое значение этот фактор приобретает при ангиогенезе и барьерогенезе, т.к. достижение функциональной компетентности клеток эндотелия сопряжено с интенсивным биогенезом митохондрий, что следует учитывать и при воспроизведении *in vitro* моделей ГЭБ или НВЕ (например, при дифференцировке стволовых клеток в клетки эндотелия или при культивировании эндотелиальных прогениторных клеток в составе НВЕ) [59].

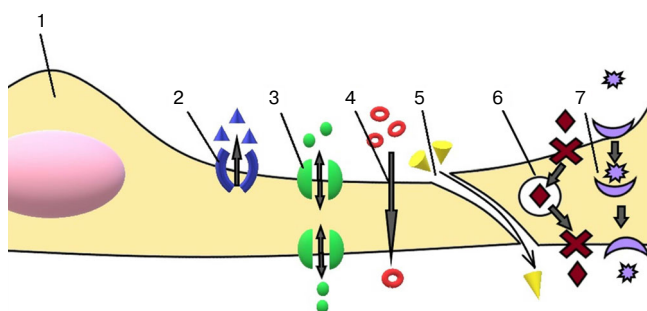
В клетках ГЭБ высок уровень гликолитической активности, что особенно характерно для периваскулярной астроглии и перицитов. Тем не менее подавление гликолиза в эндотелиоцитах также существенно влияет на их функциональное состояние, в частности это приводит к редуцированию процессов ангиогенеза [59, 60]. Периваскулярные астроциты активно утилизируют глюкозу, поступающую в НВЕ из крови за счет работы транспортеров глюкозы, активно экспрессирующихся в клетках эндотелия и астроглии. Астроциты конвертируют ее в лактат, который затем покидает клетки через монокарбоксилатные транспортеры МСТ1, МСТ4 или Sx43-полуканалы и захватывается клетками эндотелия и нейронами. Так реализуется один из механизмов глиоваскулярного контроля: увеличение локальной концентрации лактата способствует вазодилатации в функционально активных регионах головного мозга, кроме того, лактат реализует проангиогенное действие [59, 61]. Примечательно, что особенности энергопродукции в клетках церебрального эндотелия позволили некоторым авторам провести аналогию между эндотелиоцитами и опухолевыми клетка-

ми в части реализации эффекта Варбурга для стабильной генерации лактата [62]. Кроме того, клетки эндотелия микрососудов головного мозга обладают не только транспортерами лактата (в частности, МСТ1), но и рецепторами лактата GPR81, причем сниженная экспрессия обоих белков наблюдается при развитии нейровоспаления, индуцированного липополисахаридом *in vitro* [63].

Рецепторы лактата GPR81 принадлежат к большой группе белков, GPCRs (G-protein coupled receptors), которые экспрессируются в клетках церебрального эндотелия. Будучи вовлеченными в сигнальную трансдукцию, контролирующую экспрессию белков плотных, щелевых и адгезионных контактов, они тем самым определяют проницаемость барьера. Например, S1P2 (представитель группы рецепторов сфингозин-1-фосфата) является регулятором дифференцировки эндотелиоцитов, активности P-gp, экспрессии клаудина-5 и окклюдина, а рецептор лизофосфатидной кислоты, LPAR6, регулирует проницаемость ГЭБ за счет модуляции Rho-зависимых механизмов ремоделирования цитоскелета [64, 65].

Межклеточная коммуникация в пределах НВЕ и ГЭБ очень разнообразна и не может быть детализирована в пределах одного обзора. Вместе с тем понимание механизмов астроцит-эндотелиальных, перицит-эндотелиальных, нейрон-астроглиальных взаимодействий необходимо не только для разработки новых технологий управления проницаемостью ГЭБ, но и для создания *in vitro* моделей ГЭБ, НВЕ и васкуляризованной нейрогенной ниши, максимально точно учитывающих характер такой коммуникации в условиях нормы и патологии [1, 5, 60, 66]. В частности, коммуникация астроцитов и эндотелия реализуется в пределах НВЕ/ГЭБ за счет активности большого числа глиотрансмиттеров (серин, глутамат), метаболитов (лактат, жирные кислоты), цитокинов и хемокинов [67].

Особого внимания заслуживают механизмы развития нейровоспаления с участием клеток астроглиальной, микроглиальной и эндотелиальной природы, а также мигрирующих через барьер в ткань головного мозга лейкоцитов периферической крови. С учетом того, что клетки церебрального эндотелия экспрессируют рецепторы цитокинов и TLR-рецепторы, распознающие молекулы патогенов (PAMPs, pathogen-associated molecular pattern molecules) [2], эндотелий ГЭБ является активным участником индукции и прогрессирования системного воспаления и локального нейровоспаления. В частности, недавно было продемонстрировано, что в физиологических условиях микроглия НВЕ необходима



**Рис. 2.** Механизмы проницаемости гематоэнцефалического барьера. 1 – Эндотелиальная клетка; 2 – эффлюксные транспортеры (P-gp, BCRP, MRP); 3 – транспортеры растворенных веществ (SLC); 4 – пассивная диффузия; 5 – парацеллюлярный транспорт; 6 – рецептор-опосредованный транспорт; 7 – адсорбционный транзитоз

для поддержания адекватной экспрессии белков плотных контактов (например, CLDN5), тогда как при развитии системного воспаления активированные клетки микроглии разрушают контакты отростков астроцитов с клетками церебрального эндотелия, тем самым способствуя развитию патологической проницаемости ГЭБ; соответственно, подавление активации микроглии этому препятствует [68].

Не менее актуален вклад перицитов в поддержание целостности ГЭБ: отношение количества перицитов к количеству эндотелиоцитов в церебральных микрососудах в 10–30 раз выше, чем в капиллярах других тканей [69], а наличие прямых контактов между этими двумя типами клеток отражает вовлеченность перицитов в регуляцию парацеллюлярной проницаемости и трансцитоза. Действительно, во многих моделях ГЭБ *in vitro* было показано, что включение перицитов в их состав значительно улучшает показатели TEER [70, 71].

Модуляция механизмов межклеточной коммуникации в ГЭБ *in vivo* и *in vitro* традиционно достигается применением фармакологических агентов, однако внедрение и развитие протоколов прецизионного контроля активности астроцитов дает новые возможности в селективной регуляции проницаемости барьера. Например, управление секрецией глиотрансмиттеров осуществляется с использованием методов опто- и хемогенетики [72].

Базальная мембрана, окружающая клетки ГЭБ, по своей структуре соответствует внеклеточному матриксу. Она имеет толщину до 100–200 нм и включает в свой состав такие белки, как коллаген IV, ламинин, нидоген (энтактин) и гепарансульфат протеогликаны (перлекан, агрин, коллаген XVIII), а также тромбоспондины, фибулин и прочие белки, которые синтезируются клетками эндотелия микрососудов головного мозга и астроцитами [73–75]. Клетки ГЭБ являются не только продуцентами белков базальной мембраны, но также могут секретировать матриксные металлопротеиназы, разрушающие белки, тем самым повышая проницаемость ГЭБ. Такой механизм наиболее очевиден при развитии нейровоспаления и гипоксии, а при физиологических условиях – в динамике барьерогенеза и при ремоделировании церебральных микрососудов/ангиогенезе [76, 77]. Было показано, что добавление указанных белков в модели ГЭБ в качестве подложки для слоя клеток эндотелия или перицитов существенно улучшает показатели TEER [74]. Кроме того, в настоящее время разрабатываются новые материалы, способные имитировать структуру и микроархитектуру базальной мембраны, а также

делать ее доступной для каталитической активности протеаз, что определяет ее способность к ремоделированию и деградации, а также пригодность к применению в *in vitro* моделях ГЭБ [78].

Степень зрелости ГЭБ к моменту рождения до сих пор остается предметом дискуссий: некоторые авторы считают, что ГЭБ является зрелым уже к рождению, другие придерживаются точки зрения о том, что требуется не менее 2–3 недель постнатального развития для окончательного созревания барьера, что, фактически, определяется характером церебрального ангиогенеза [79, 80]. Барьерогенез *in vitro* регулируется HIF-1-опосредованными событиями [81] и лактат-продуцирующей активностью периваскулярной астроглии [60], что делает *in vitro* модели ГЭБ, созданные с использованием церебральных эндотелиоцитов, полученных от животных на самых ранних стадиях онтогенеза, пригодными для изучения молекулярных механизмов формирования барьера в норме и при патологии. С другой стороны, феномен избыточного церебрального неоангиогенеза, характерный для ряда нейродегенеративных заболеваний, например, болезни Альцгеймера [82], требует дополнительного изучения формирования и поддержания целостности барьера в стареющем головном мозге. Известно, что динамические изменения экспрессии различных белков характеризуют разные этапы онтогенеза, в том числе физиологическое старение [83], поэтому моделирование ГЭБ *in vitro*, учитывающего возрастные аспекты состояния клеток-компонентов барьера, является весьма нетривиальной задачей [4]. Более того, простая экстраполяция данных, полученных на клеточных моделях без учета возрастных особенностей организма, может привести к некорректным выводам о механизмах реализации тех или иных процессов, при которых степень зрелости барьера или интенсивность ангиогенеза/барьерогенеза являются значимыми.

#### **ПАТОБИОХИМИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ И ПРОЯВЛЕНИЯ ПОВРЕЖДЕНИЯ ГЭБ ПРИ СТРЕССЕ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ**

Развитие патологически повышенной проницаемости ГЭБ при остром и хроническом стрессе является экспериментально и клинически доказанным феноменом, причем характер стрессора, индуцирующего такого рода повреждение, не играет специфической роли. Например, хронический иммобилизационный стресс у крыс вызывает увеличение проницаемости ГЭБ в гиппокампе, мозжечке [84], миндалевидном теле, что соот-

ветствует области нарушения экспрессии белков плотных и адгезионных контактов и увеличению локальной концентрации провоспалительных цитокинов [85]. Примечательно, что хронический стресс, связанный с ограничением движения экспериментальных животных, приводит не только к увеличению проницаемости ГЭБ, но и к ремоделированию сосудов (уменьшению их диаметра и размера) вследствие дизрегуляции экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и CLDN5 [86]. Полученные недавно данные свидетельствуют о том, что стресс, обусловленный действием интенсивного звука (музыки громкостью 90–100 дБ и частотой до 10 кГц в течение 2 ч), индуцирует патологическую проницаемость ГЭБ у экспериментальных мышей в 11 исследованных регионах мозга с нарушением экспрессии окклюдина и CLDN5, апоптозом клеток эндотелия; при этом барьер имеет тенденцию к восстановлению проницаемости через 4 ч после действия острого стрессора [87].

Стресс раннего периода жизни индуцируется факторами, действующими пренатально или в раннем постнатальном периоде, что приводит к нарушениям развития головного мозга, аберрантному поведению (депрессия) и формированию т.н. «феномена раннего программирования» (повышение риска развития нейродегенерации в отдаленных периодах онтогенеза) [88, 89]. Перинатальная гипоксия и сепарация от матери вызывает у крыс изменения экспрессии MCT1 и MCT4 в клетках эндотелия микрососудов головного мозга, что сопровождается снижением эффективности барьерогенеза в срок до 14 суток постнатального развития [90]. Эти процессы ассоциированы с изменением экспрессии белков плотных контактов и caveолина (CLDN5, ZO-1, JAM1, Cav1), белков-участников HIF-1-сопряженных клеточных сигнальных систем (HIF-1, GSK3, Rac1, GLUT, NFAT), изменением продукции про- и антиангиогенных факторов клетками астроглиальной природы (VEGF, TS, MMP2, MMP9) и их рецепторов в клетках церебрального эндотелия (VEGFR2, CD36, CD47), изменением экспрессии белков-регуляторов транспорта, рецепции лактата в клетках НВЕ (MCT1, MCT4, CD147, GPR81) в коре, гиппокампе и миндалевидном теле модельных животных (данные получены на 7-й и 70-й дни постнатального развития) [91].

При болезни Альцгеймера дисфункция НВЕ и ГЭБ обусловлена несколькими механизмами:

1) церебральная гипоперфузия, нарушение клиренса и аккумуляция Аβ в сосудистой стенке, а также в базальной мембране ГЭБ [74, 92];

2) повреждение клеток эндотелия и перицитов [70];

3) дизрегуляция аквапорина AQP4 в периваскулярной астроглии [93];

4) ремоделирование микрососудов головного мозга, приводящее к усиленному неангиогенезу с формированием капилляров с патологически проницаемой стенкой [82];

5) изменение продукции энергии в эндотелиоцитах вследствие повреждения митохондрий и нарушения митохондриальной динамики [57, 94];

6) развитие локальной инсулинорезистентности и нейровоспаления [95];

7) миграция активированной микроглии в периваскулярное пространство, секреция провоспалительных цитокинов [96];

8) дисфункция лимфатической системы головного мозга, препятствующая эффективному клиренсу продуктов метаболизма и поврежденных белков [97];

9) нарушение экспрессии белков-транспортеров в клетках эндотелия (в частности, P-gp и SLC), что способствует нарушению трансцитоза, прогрессированию метаболических нарушений, аберрантному ангиогенезу, формированию измененной чувствительности к действию фармакологических препаратов [98–100].

Первичные дефекты в транспортных механизмах клеток церебрального эндотелия или в формировании плотных и адгезионных межклеточных контактов способствуют аккумуляции Аβ в ткани головного мозга; существует и обратная зависимость – прогрессирующая нейродегенерация ответственна за вторичное повреждение ГЭБ [101]. Дополнительными факторами, способствующими дисфункции НВЕ и повреждению ГЭБ при болезни Альцгеймера, являются локальная инсулинорезистентность, нейровоспаление и окислительный стресс [70]. Повышение проницаемости ГЭБ является одним из ключевых компонентов патогенеза когнитивной дисфункции при болезни мелких сосудов головного мозга, характеризующейся деменцией [102]. Поврежденный ГЭБ (преимущественно в области гиппокампа) – один из самых ранних маркеров когнитивного дефицита иной (не альцгеймеровской) этиологии [103, 104].

Повреждение ГЭБ является важным компонентом патогенеза и других видов хронической нейродегенерации. Абберрантный ангиогенез сопровождает развитие болезни Паркинсона (по типу гиперваскуляризации с патологически высокой проницаемостью микрососудов, как при болезни Альцгеймера) и болезни Гентингтона (нарушение ангиогенной активности эндотелия) [105, 106]. ГЭБ при болезни Паркинсона характеризуется повышенной проницаемостью, нарушениями экспрессии белков-транспорте-

ров, в частности Р-gp [107] и белков плотных контактов, развитием глиоза и неоангиогенеза в области стриатума [40]. Повреждение ГЭБ при болезни Гентингтона связано с нарушением структурно-функциональной целостности барьера, что определяется повреждением клеток эндотелия церебральных микрососудов, снижением их ангиогенной активности и барьерных свойств, как впервые было показано на клетках эндотелия, полученных из иПСК пациентов с этим заболеванием [106]. Исследования *in vivo* показали, что характерными признаками повреждения ГЭБ при болезни Гентингтона являются увеличение плотности микрососудов со снижением их среднего диаметра в стриатуме и снижение экспрессии белков плотных контактов, причем такие нарушения развиваются на самых ранних стадиях нейродегенерации [39].

Результатом всех перечисленных изменений в структуре и функциональной активности ГЭБ при стрессе и нейродегенерации могут быть следующие патогенетически значимые события:

1) прогрессирование нейровоспаления вследствие облегченной миграции лейкоцитов и трансфера молекул с провоспалительной активностью в ткань головного мозга;

2) нарушение нейрогенеза вследствие расстройства функционирования т.н. васкулярного скаффолда нейрогенных ниш (субвентрикулярная зона, субгранулярная зона);

3) изменение механизмов нейропластичности вследствие нарушения процессов ангиогенеза;

4) повреждение механизмов глиоваскулярного контроля вследствие дизрегуляции продукции, транспорта и рецепции лактата в активных зонах головного мозга;

5) нарушение фармакокинетики лекарственных препаратов;

6) прогрессирование неврологического, в том числе когнитивного, дефицита, поведенческих расстройств (тревожность, депрессия) (таблица).

Очевидно, что изучение патобиохимических механизмов дисфункции ГЭБ при стрессе и нейродегенерации является актуальной задачей современной нейробиологии и нейробиологии, а ее решение существенным образом зависит от прогресса в разработке новых моделей НВЕ и ГЭБ для трансляционных исследований *in vitro*.

### ПРОБЛЕМЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ *in vitro* МОДЕЛЕЙ ГЭБ И НВЕ

В настоящее время основным подходом к моделированию НВЕ и ГЭБ становится приме-

нение протоколов, позволяющих воссоздать многомерные межклеточные взаимодействия в пределах этих структур [108, 109]. Поэтому наряду с моделями, выполненными с использованием технологии transwell (размещение эндотелиальных клеток планарно и дистантно от остальных клеток-компонентов НВЕ/ГЭБ), все большее распространение получают модели с воспроизведением 3D-структуры НВЕ/ГЭБ (размещение клеток в составе аналога внеклеточного матрикса, например, в гидрогеле) [110]. Кроме того, в качестве моделей интерес представляют сфероиды, состоящие из астроцитов и нейронов, окруженных слоем перицитов и клеток эндотелия церебральных микрососудов [8], а также органоиды, полученные из стволовых клеток, в том числе из иПСК [111–113]. Следует отметить, что органоиды в меньшей степени пригодны для изучения НВЕ и ГЭБ в силу технологических трудностей с достижением их васкуляризации.

Несмотря на определенные технические сложности, необходимость создания новых моделей ГЭБ и НВЕ не вызывает сомнений, так как тестирование проницаемости ГЭБ, например, для лекарств-кандидатов на лабораторных животных является более дорогостоящим, трудоемким и этически спорным, а также может приводить к ложноположительным или ложноотрицательным результатам. С использованием моделей других гистогематических барьеров было показано, что более 3/4 всех прототипов лекарственных средств, которые были успешно испытаны на животных моделях, потерпели неудачу при последующих клинических испытаниях [114]. Не менее проблематичным, по крайней мере, на настоящий момент, является применение *in silico* моделей ГЭБ. Они достаточно эффективны при анализе лекарственной структуры с хорошо изученным механизмом действия, однако малоприспособлены для оценки проницаемости барьера для соединений с ранее не описанной структурой и свойствами. Кроме того, анализ влияния соединений на сами клетки ГЭБ также является непростой задачей [115]. Разумеется, внедрение технологий машинного обучения обеспечит существенный прогресс в применении *in silico* моделей ГЭБ [116].

В связи с указанными проблемами применения *in vivo* и *in silico* моделей ГЭБ, создание новых *in vitro* моделей остается ключевой задачей нейробиоинженерии, -химии и -биологии. Модель ГЭБ *in vitro* должна соответствовать ряду критериев, выполнение которых необходимо для ее применения в трансляционных исследованиях, в частности это определенная проницаемость, экспрессия транспортных молекул и белков тесных контактов, геометрия модели,

Основные механизмы и последствия нарушений структурно-функциональной целостности ГЭБ при стрессе и нейродегенерации

Вид патологии	Характеристика повреждения ГЭБ	Патогенетически значимые последствия повреждения ГЭБ
Стресс раннего периода жизни	нарушение экспрессии белков плотных контактов, транспортеров лактата; изменение локальной продукции и рецепции молекул с про- и антиангиогенной активностью	абберрантный барьерогенез и ангиогенез в раннем постнатальном периоде; нарушения нейропластичности – подавление нейрогенеза вследствие повреждения васкулярного скаффолда нейрогенных ниш; формирование «феномена раннего программирования»
Болезнь Альцгеймера	нарушение клиренса и отложение амилоида в сосудистой стенке; развитие локального нейровоспаления; амилоид-индуцированная митохондриальная дисфункция в клетках эндотелия; гипометаболизм глюкозы и нарушение метаболического сопряжения нейронов, астроцитов и эндотелиоцитов; избыточный ангиогенез с формированием сосудов с высокой проницаемостью; изменения экспрессии белков-транспортеров, повреждение перицитов	развитие церебральной амилоидной ангиопатии с ремоделированием сосудов, приводящей к нарушению микроциркуляции, в том числе в гиппокампе, и способствующее гибели нейронов и нарастанию когнитивного дефицита; развитие нейровоспаления и локальной инсулинорезистентности в ткани мозга
Болезнь Паркинсона	ремоделирование сосудов – гиперваскуляризация с патологически высокой проницаемостью сосудистой стенки; развитие глиоза; нарушение экспрессии белков плотных контактов и белков-транспортеров	нарушение микроциркуляции в стриатуме, приводящее к энергодифициту и гибели нейронов; прогрессирование нейровоспаления и неврологического дефицита
Болезнь Гентингтона	аккумуляция агрегированного хантингтина; подавление ангиогенеза; нарушение экспрессии белков плотных контактов; повреждение клеток церебрального эндотелия; активация перицитов	редуцирование диаметра микрососудов стриатума; прогрессирование нейровоспаления; реализация сосудистого компонента патогенеза заболевания

присутствие внеклеточного матрикса, возможность совместного культивирования с другими клетками ГЭБ и НВЕ (например, астроцитами, перицитами) [117]. В исследовательской практике и на рынке в настоящее время представлены разнообразные модели ГЭБ *in vitro*: статические, динамические, моно- и мультиклеточные, причем зачастую они предлагаются в виде «клеточных конструкторов», элементы которых соединяются в микропланшетах *ex tempore* [80, 118].

В целом, основные преимущества клеточных моделей ГЭБ *in vitro* включают следующие параметры:

1) стандартизированный подход к оценке проницаемости барьера, высокая воспроизводимость полученных результатов;

2) возможность оценки метаболических и функциональных изменений, происходящих в ГЭБ, с оценкой межклеточных взаимодействий в норме и при патологии;

3) имитация транспортных свойств ГЭБ, критичных для оценки эффективности новых способов управления проницаемостью ГЭБ;

4) легкость в применении, сокращение времени при проведении фармакологических исследований [119].

Применительно к микрофлюидным моделям дополнительными преимуществами являются минимальные размеры и, соответственно, минимальные расходы клеток, реактивов, питательных сред, а также воспроизведение некоторых механизмов активации и/или повреждения клеток эндотелия, которые возникают в результате движения крови в микрососуде [4, 38, 119]. В контексте валидности модели ГЭБ это означает возможность достижения большего уровня TEER, характеризующего структурную и функциональную целостность барьера, по сравнению со статическими моделями. В динамической модели TEER достигает 2000–4000 Ом/см<sup>2</sup>, а в аналогичной статической модели – всего 120–150 Ом/см<sup>2</sup> [80, 118]. Интересно, что культивирование клеток эндотелия церебральных микрососудов из иПСК позволило получить монослой с TEER более 5000 Ом/см<sup>2</sup>, что обусловлено адекватной экспрессией белков-компонентов плотных и адгезионных контактов, а также трансмембранных транспортеров [49]. В целом, новое поколение *in vitro* моделей ГЭБ хорошо зарекомендовало себя для изучения молекулярного патогенеза нейродегенеративных заболеваний и тестирования лекарств-кандидатов. Тем не менее нерешенным

остался достаточно широкий круг методологических вопросов, в частности, связанных с функциональной компетентностью клеток церебрального эндотелия (например, «эндотелиоциты», полученные из индуцированных плюрипотентных клеток, не демонстрируют соответствующий экспрессионный профиль и являются более приближенными к эпителию), разработкой новых (био)скаффолдов для создания 3D-моделей с контролируемой проницаемостью и сопоставимыми с реальными межклеточными взаимодействиями, с воспроизведением в моделях «естественных» механизмов движения жидкости вдоль эндотелиального слоя [9, 71, 120, 121], поэтому создание новых *in vitro* моделей ГЭБ является важной задачей современной нейроинженерии и нейробиологии. Решение этих вопросов обеспечит прогресс в разработке и клиническом применении персонализированных моделей ГЭБ, пригодных для индивидуальной оценки проницаемости барьера для нейротропных препаратов, а также в развитии технологий «brain-on-chip».

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Механизмы функционирования ГЭБ в физиологических условиях, а также при заболеваниях ЦНС переместились в фокус нейробиологов и нейробиологов в течение последних двух десятков лет, что связано с необходимостью решения не только фундаментальных, но и прикладных задач. Действительно, в настоящее время накапливается все больше экспериментальных и клинических доказательств того, что повреждение

ГЭБ не только маркирует развитие нейродегенерации, нейровоспаления или гипоксии головного мозга, но и вносит существенный вклад в прогрессирование патологии, является ранним (вполне возможно, досимптоматическим) признаком заболевания, может быть «мишенью» для разработки современных технологий коррекции неврологического дефицита.

Для решения этих задач и обеспечения максимально быстрого и эффективного трансфера результатов в практическую деятельность требуется создание новых моделей ГЭБ, НВЕ и головного мозга *in vitro*, которые могут быть успешно валидированы для их применения в трансляционных исследованиях. Прогресс в этом направлении обеспечивается достижениями в области биохимии, клеточной биологии, молекулярной биологии, биоинженерии, биофотоники, визуализации. Несомненно, развитие таких исследований сформирует и новые возможности для смежных направлений — регенеративной медицины, нейрофармакологии и нейрореабилитации.

**Финансирование.** Работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ РФ (НШ-2547.2020.7).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khilazheva, E. D., Boytsova, E. B., Pozhilenkova, E. A., Solonchuk, Y. R., and Salmina, A. B. (2015) Obtaining a three-cell model of a neurovascular unit *in vitro*, *Cell Tissue Biol.*, **9**, 447-451, doi: 10.1134/s1990519x15060048.
2. Tohidpour, A., Morgun, A. V., Boitsova, E. B., Malinovskaya, N. A., Martynova, G. P., et al. (2017) Neuroinflammation and infection: molecular mechanisms associated with dysfunction of neurovascular unit, *Front. Cell Infect. Microbiol.*, **7**, 276, doi: 10.3389/fcimb.2017.00276.
3. Morgun A. V., Кувачева Н. В., Таранушенко Т. Е., Хилажева Е. Д., Малиновская Н. А., и др. (2013) Современные представления о патогенезе перинатального ишемического повреждения клеток нейроваскулярной единицы головного мозга: молекулы-мишени для нейропротекции, *Вестник Российской академии медицинских наук*, **68**, 26-35, doi: 10.15690/vramn.v68i12.856.
4. Osipova, E. D., Komleva, Y. K., Morgun, A. V., Lopatina, O. L., Panina, Y. A., et al. (2018) Designing *in vitro* blood-brain barrier models reproducing alterations in brain aging, *Front. Aging Neurosci.*, **10**, 234-234, doi: 10.3389/fnagi.2018.00234.
5. Salmina, A., Morgun, A., Kuvacheva, N., Lopatina, O., Komleva, Y., et al. (2014) Establishment of neurogenic microenvironment in the neurovascular unit: the connexin 43 story, *Rev. Neurosci.*, **25**, 1-15, doi: 10.1515/revneuro-2013-0044.
6. Sharma, B., Luhach, K., and Kulkarni, G. T. (2019) 4 – *In vitro and in vivo models of BBB to evaluate brain targeting drug delivery*. in *Brain Targeted Drug Delivery System* (Gao, H., and Gao, X., eds.) Academic Press, pp. 53-101.
7. Mabondzo, A., Bottlaender, M., Guyot, A. C., Tsaouin, K., Deverre, J. R., and Balimane, P. V. (2010) Validation of *in vitro* cell-based human blood-brain barrier model using clinical positron emission tomography radioligands to predict *in vivo* human brain penetration, *Mol. Pharm.*, **7**, 1805-1815, doi: 10.1021/mp1002366.
8. Cho, C. F., Wolfe, J. M., Fadzen, C. M., Calligaris, D., Hornburg, K., et al. (2017) Blood-brain-barrier spheroids as an *in vitro* screening platform for brain-penetrating agents, *Nat. Commun.*, **8**, 15623, doi: 10.1038/ncomms15623.
9. Appelt-Menzel, A., Cubukova, A., Günther, K., Edenhofer, F., Piontek, J., et al. (2017) Establishment of a human blood-brain barrier co-culture model mimicking the neurovascular unit using induced pluri- and multipotent stem cells, *Stem Cell Rep.*, **8**, 894-906, doi: 10.1016/j.stemcr.2017.02.021.
10. Bonakdar, M., Graybill, P. M., and Davalos, R. V. (2017) A microfluidic model of the blood-brain barrier to study per-



- meabilization by pulsed electric fields, *RSC Adv.*, **7**, 42811–42818, doi: 10.1039/c7ra07603g.
11. Lu, T. M., Houghton, S., Magdeldin, T., Durán, J. G. B., Minotti, A. P., et al. (2021) Pluripotent stem cell-derived epithelium misidentified as brain microvascular endothelium requires ETS factors to acquire vascular fate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2016950118, doi: 10.1073/pnas.2016950118.
  12. Knowland, D., Arac, A., Sekiguchi, K. J., Hsu, M., Lutz, S. E., et al. (2014) Stepwise recruitment of transcellular and paracellular pathways underlies blood-brain barrier breakdown in stroke, *Neuron*, **82**, 603–617, doi: 10.1016/j.neuron.2014.03.003.
  13. Wimmer, I., Tietz, S., Nishihara, H., Deutsch, U., Sallusto, F., et al. (2019) PECAM-1 stabilizes blood-brain barrier integrity and favors paracellular t-cell diapedesis across the blood-brain barrier during neuroinflammation, *Front. Immunol.*, **10**, doi: 10.3389/fimmu.2019.00711.
  14. De Bock, M., Van Haver, V., Vandenbroucke, R. E., Decroock, E., Wang, N., and Leybaert, L. (2016) Into rather unexplored terrain-transcellular transport across the blood-brain barrier, *Glia*, **64**, 1097–1123, doi: 10.1002/glia.22960.
  15. Kaplan, L., Chow, B. W., and Gu, C. (2020) Neuronal regulation of the blood-brain barrier and neurovascular coupling, *Nat. Rev. Neurosci.*, **21**, 416–432, doi: 10.1038/s41583-020-0322-2.
  16. Stamatovic, S. M., Keep, R. F., and Andjelkovic, A. V. (2008) Brain endothelial cell–cell junctions: how to “open” the blood brain barrier, *Curr. Neuropharmacol.*, **6**, 179–192, doi: 10.2174/157015908785777210.
  17. Erickson, M. A., Wilson, M. L., and Banks, W. A. (2020) *In vitro* modeling of blood-brain barrier and interface functions in neuroimmune communication, *Fluids Barr. CNS*, **17**, 26–26, doi: 10.1186/s12987-020-00187-3.
  18. González-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., and Jaramillo, B. E. (2003) Tight junction proteins, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, **81**, 1–44, doi: 10.1016/s0079-6107(02)00037-8.
  19. Rhett, J. M., Jourdan, J., and Gourdie, R. G. (2011) Connexin 43 connexon to gap junction transition is regulated by zonula occludens-1, *Mol. Biol. Cell*, **22**, 1516–1528, doi: 10.1091/mbc.E10-06-0548.
  20. Tornabene, E., Helms, H. C. C., Pedersen, S. F., and Brodin, B. (2019) Effects of oxygen-glucose deprivation (OGD) on barrier properties and mRNA transcript levels of selected marker proteins in brain endothelial cells/astrocyte co-cultures, *PLoS One*, **14**, e0221103, doi: 10.1371/journal.pone.0221103.
  21. Basu, R., and Das Sarma, J. (2018) Connexin 43/47 channels are important for astrocyte/oligodendrocyte cross-talk in myelination and demyelination, *J. Biosci.*, **43**, 1055–1068, doi: 10.1007/s12038-018-9811-0.
  22. Johnson, A. M., Roach, J. P., Hu, A., Stamatovic, S. M., Zochowski, M. R., et al. (2018) Connexin 43 gap junctions contribute to brain endothelial barrier hyperpermeability in familial cerebral cavernous malformations type III by modulating tight junction structure, *FASEB J.*, **32**, 2615–2629, doi: 10.1096/fj.201700699R.
  23. Contreras, J. E., Sánchez, H. A., Eugenin, E. A., Speidel, D., Theis, M., et al. (2002) Metabolic inhibition induces opening of unapposed connexin 43 gap junction hemichannels and reduces gap junctional communication in cortical astrocytes in culture, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 495–500, doi: 10.1073/pnas.012589799.
  24. Salmina, A., Inzhutova, A., Morgun, A., Okuneva, O., Malinovskaia, N., et al. (2012) NAD<sup>+</sup>-converting enzymes in neuronal and glial cells: CD38 as a novel target for neuroprotection, *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk/Rossiiskaia Akademiia Meditsinskikh Nauk*, **67**, 29–37, doi: 10.15690/vramn.v67i10.413.
  25. Alla, B. S., Raissa Ya, O., Mami, N., and Haruhiro, H. (2006) ADP-ribosyl cyclase as a therapeutic target for central nervous system diseases, *Central Nervous System Agents Med. Chem.*, **6**, 193–210, doi: 10.2174/187152406778226699.
  26. Yao, L., Xue, X., Yu, P., Ni, Y., and Chen, F. (2018) Evans blue dye: a revisit of its applications in biomedicine, *Contrast Media Mol. Imaging*, **73**, 1–10, doi: 10.1155/2018/7628037.
  27. Mathiesen Janiurek, M., Soyulu-Kucharz, R., Christoffersen, C., Kucharz, K., and Lauritzen, M. (2019) Apolipoprotein M-bound sphingosine-1-phosphate regulates blood–brain barrier paracellular permeability and transcytosis, *eLife*, **8**, e49405, doi: 10.7554/eLife.49405.
  28. Forcione, M., Chiarelli, A. M., Davies, D. J., Perpetuini, D., Sawosz, P., et al. (2020) Cerebral perfusion and blood-brain barrier assessment in brain trauma using contrast-enhanced near-infrared spectroscopy with indocyanine green: a review, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **40**, 1586–1598, doi: 10.1177/0271678x20921973.
  29. Israeli, D., Tanne, D., Daniels, D., Last, D., Shneur, R., et al. (2011) The Application of MRI for depiction of subtle blood brain barrier disruption in stroke, *Int. J. Biol. Sci.*, **7**, 1–8, doi: 10.7150/ijbs.7.1.
  30. Heye, A. K., Culling, R. D., Valdés Hernández, M. D. C., Thrippleton, M. J., and Wardlaw, J. M. (2014) Assessment of blood–brain barrier disruption using dynamic contrast-enhanced MRI. A systematic review, *NeuroImage: Clin.*, **6**, 262–274, doi: 10.1016/j.nicl.2014.09.002.
  31. Okada, M., Kikuchi, T., Okamura, T., Ikoma, Y., Tsuji, A. B., et al. (2015) *In vivo* imaging of blood-brain barrier permeability using positron emission tomography with 2-amino-[3-<sup>11</sup>C]isobutyric acid, *Nucl. Med. Commun.*, **36**, 1239–1248, doi: 10.1097/mnm.0000000000000385.
  32. Liang, Y., and Yoon, J.-Y. (2021) *In situ* sensors for blood-brain barrier (BBB) on a chip, *Sensors Actuators Rep.*, **3**, 100031, doi: 10.1016/j.snr.2021.100031.
  33. Azarmi, M., Maleki, H., Nikkam, N., and Malekinejad, H. (2020) Transcellular brain drug delivery: A review on recent advancements, *Int. J. Pharm.*, **586**, 119582, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119582.
  34. Winger, R. C., Koblinski, J. E., Kanda, T., Ransohoff, R. M., and Muller, W. A. (2014) Rapid remodeling of tight junctions during paracellular diapedesis in a human model of the blood-brain barrier, *J. Immunol.*, **193**, 2427–2437, doi: 10.4049/jimmunol.1400700.
  35. Winkler, L., Blasig, R., Breitkreuz-Korff, O., Berndt, P., Dithmer, S., et al. (2021) Tight junctions in the blood-brain barrier promote edema formation and infarct size in stroke – ambivalent effects of sealing proteins, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **41**, 132–145, doi: 10.1177/0271678x20904687.
  36. Gao, X., Qian, J., Zheng, S., Changyi, Y., Zhang, J., et al. (2014) Overcoming the blood-brain barrier for delivering drugs into the brain by using adenosine receptor nanoagony, *ACS Nano*, **8**, 3678–3689, doi: 10.1021/nn5003375.
  37. Burgess, A., Shah, K., Hough, O., and Hynnen, K. (2015) Focused ultrasound-mediated drug delivery through the blood-brain barrier, *Expert Rev. Neurother.*, **15**, 477–491, doi: 10.1586/14737175.2015.1028369.
  38. Ahn, S. I., Sei, Y. J., Park, H.-J., Kim, J., Ryu, Y., et al. (2020) Microengineered human blood-brain barrier platform for understanding nanoparticle transport mechanisms, *Nat. Commun.*, **11**, 175, doi: 10.1038/s41467-019-13896-7.
  39. Di Pardo, A., Amico, E., Scalabri, F., Pepe, G., Castaldo, S., et al. (2017) Impairment of blood-brain barrier is an early event in R6/2 mouse model of Huntington disease, *Sci. Rep.*, **7**, 41316, doi: 10.1038/srep41316.
  40. Gray, M. T., and Woulfe, J. M. (2015) Striatal blood-brain barrier permeability in Parkinson’s disease, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **35**, 747–750, doi: 10.1038/jcbfm.2015.32.
  41. Greene, C., Hanley, N., and Campbell, M. (2020) Blood-brain barrier associated tight junction disruption is a hallmark feature of major psychiatric disorders, *Translat. Psychiatry*, **10**, 373, doi: 10.1038/s41398-020-01054-3.
  42. Cockerill, I., Oliver, J.-A., Xu, H., Fu, B. M., and Zhu, D. (2018) *Blood-Brain Barrier Integrity and Clearance of*

- Amyloid- $\beta$  from the BBB. in Molecular, Cellular, and Tissue Engineering of the Vascular System* (Fu, B. M., and Wright, N. T., eds.) Springer International Publishing, Cham, pp. 261-278.
43. Xu, X., Zhu, L., Xue, K., Liu, J., Wang, J., et al. (2021) Ultrastructural studies of the neurovascular unit reveal enhanced endothelial transcytosis in hyperglycemia-enhanced hemorrhagic transformation after stroke, *CNS Neurosci. Ther.*, **27**, 123-133, doi: 10.1111/cns.13571.
  44. Van Assema, D. M. E., Lubberink, M., Boellaard, R., Schuit, R. C., Windhorst, A. D., et al. (2012) P-glycoprotein function at the blood-brain barrier: effects of age and gender, *Mol. Imaging Biol.*, **14**, 771-776, doi: 10.1007/s11307-012-0556-0.
  45. Aryal, M., Fischer, K., Gentile, C., Gitto, S., Zhang, Y.-Z., and McDannold, N. (2017) Effects on P-glycoprotein expression after blood-brain barrier disruption using focused ultrasound and microbubbles, *PLoS One*, **12**, e0166061, doi: 10.1371/journal.pone.0166061.
  46. Wang, W., Bodles-Brakhop, A. M., and Barger, S. W. (2016) A role for P-glycoprotein in clearance of Alzheimer amyloid  $\beta$ -peptide from the brain, *Curr. Alzheimer Res.*, **13**, 615-620, doi: 10.2174/1567205013666160314151012.
  47. Ristori, E., Donnini, S., and Ziche, M. (2020) New insights into blood-brain barrier maintenance: the homeostatic role of  $\beta$ -amyloid precursor protein in cerebral vasculature, *Front. Physiol.*, **11**, 1056-1056, doi: 10.3389/fphys.2020.01056.
  48. Geier, E. G., Chen, E. C., Webb, A., Papp, A. C., Yee, S. W., et al. (2013) Profiling solute carrier transporters in the human blood-brain barrier, *Clin. Pharmacol. Ther.*, **94**, 636-639, doi: 10.1038/clpt.2013.175.
  49. Goldeman, C., Andersen, M., Al-Robai, A., Buchholtz, T., Svane, N., et al. (2021) Human induced pluripotent stem cells (BIONi010-C) generate tight cell monolayers with blood-brain barrier traits and functional expression of large neutral amino acid transporter 1 (SLC7A5), *Eur. J. Pharm. Sci.*, **156**, 105577, doi: 10.1016/j.ejps.2020.105577.
  50. Omori, K., Tachikawa, M., Hirose, S., Taii, A., Akanuma, S. I., et al. (2020) Developmental changes in transporter and receptor protein expression levels at the rat blood-brain barrier based on quantitative targeted absolute proteomics, *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **35**, 117-123, doi: 10.1016/j.dmpk.2019.09.003.
  51. Goldeman, C., Ozgür, B., and Brodin, B. (2020) Culture-induced changes in mRNA expression levels of efflux and SLC-transporters in brain endothelial cells, *Fluids Barriers CNS*, **17**, 32, doi: 10.1186/s12987-020-00193-5.
  52. Jossierand, V., Pélerin, H., de Bruin, B., Jegou, B., Kuhnast, B., et al. (2006) Evaluation of drug penetration into the brain: a double study by *in vivo* imaging with positron emission tomography and using an *in vitro* model of the human blood-brain barrier, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **316**, 79-86, doi: 10.1124/jpet.105.089102.
  53. Roux, G. L., Jarray, R., Guyot, A. C., Pavoni, S., Costa, N., et al. (2019) Proof-of-concept study of drug brain permeability between *in vivo* human brain and an *in vitro* iPSCs-human blood-brain barrier model, *Sci. Rep.*, **9**, 16310, doi: 10.1038/s41598-019-52213-6.
  54. Li, Y., Sun, X., Liu, H., Huang, L., Meng, G., et al. (2019) Development of human *in vitro* brain-blood barrier model from induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells to predict the *in vivo* permeability of drugs, *Neurosci. Bull.*, **35**, 996-1010, doi: 10.1007/s12264-019-00384-7.
  55. Feng, W., Zhang, C., Yu, T., Semyachkina-Glushkovskaya, O., and Zhu, D. (2019) *In vivo* monitoring blood-brain barrier permeability using spectral imaging through optical clearing skull window, *J. Biophotonics*, **12**, e201800330, doi: 10.1002/jbio.201800330.
  56. Semyachkina-Glushkovskaya, O., Chehonin, V., Borisova, E., Fedosov, I., Namykin, A., et al. (2018) Photodynamic opening of the blood-brain barrier and pathways of brain clearing, *J. Biophotonics*, **11**, e201700287, doi: 10.1002/jbio.201700287.
  57. Kluge, M. A., Fetterman, J. L., and Vita, J. A. (2013) Mitochondria and endothelial function, *Circ. Res.*, **112**, 1171-1188, doi: 10.1161/circresaha.111.300233.
  58. Doll, D. N., Hu, H., Sun, J., Lewis, S. E., Simpkins, J. W., and Ren, X. (2015) Mitochondrial crisis in cerebrovascular endothelial cells opens the blood-brain barrier, *Stroke*, **46**, 1681-1689, doi: 10.1161/strokeaha.115.009099.
  59. Malinovskaya, N. A., Komleva, Y. K., Salmin, V. V., Morgun, A. V., Shuvaev, A. N., et al. (2016) Endothelial progenitor cells physiology and metabolic plasticity in brain angiogenesis and blood-brain barrier modeling, *Front. Physiol.*, **7**, doi: 10.3389/fphys.2016.00599.
  60. Salmina, A. B., Kuvacheva, N. V., Morgun, A. V., Komleva, Y. K., Pozhilenkova, E. A., et al. (2015) Glycolysis-mediated control of blood-brain barrier development and function, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **64**, 174-184, doi: 10.1016/j.biocel.2015.04.005.
  61. Khilazheva, E. D., Kuvacheva, N. V., Morgun, A. V., Boitsova, E. B., Malinovskaya, N. A., et al. (2016) Modulation of lactate production, transport and reception by cells in the model of brain neurovascular unit, *Eksp. Klin. Farmakol.*, **79**, 7-12.
  62. Verdegem, D., Moens, S., Stapor, P., and Carmeliet, P. (2014) Endothelial cell metabolism: parallels and divergences with cancer cell metabolism, *Cancer Metab.*, **2**, 19, doi: 10.1186/2049-3002-2-19.
  63. Boitsova, E. B., Morgun, A. V., Osipova, E. D., Pozhilenkova, E. A., Martinova, G. P., et al. (2018) The inhibitory effect of LPS on the expression of GPR81 lactate receptor in blood-brain barrier model *in vitro*, *J. Neuroinflammation*, **15**, 196-196, doi: 10.1186/s12974-018-1233-2.
  64. Pluimer, B. R., Colt, M., and Zhao, Z. (2020) G protein-coupled receptors in the mammalian blood-brain barrier, *Front. Cell Neurosci.*, **14**, 139-139, doi: 10.3389/fncel.2020.00139.
  65. Kim, D. G., Jang, M., Choi, S. H., Kim, H. J., Jhun, H., et al. (2018) Gintonin, a ginseng-derived exogenous lysophosphatidic acid receptor ligand, enhances blood-brain barrier permeability and brain delivery, *Int. J. Biol. Macromol.*, **114**, 1325-1337, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.03.158.
  66. Pozhilenkova, E. A., Lopatina, O. L., Komleva, Y. K., Salmin, V. V., and Salmina, A. B. (2017) Blood-brain barrier-supported neurogenesis in healthy and diseased brain, *Rev. Neurosci.*, **28**, 397-415, doi: 10.1515/revneuro-2016-0071.
  67. Osipova, E. D., Semyachkina-Glushkovskaya, O. V., Morgun, A. V., Pisareva, N. V., Malinovskaya, N. A., et al. (2018) Gliotransmitters and cytokines in the control of blood-brain barrier permeability, *Rev. Neurosci.*, **29**, 567-591, doi: 10.1515/revneuro-2017-0092.
  68. Haruwaka, K., Ikegami, A., Tachibana, Y., Ohno, N., Konishi, H., et al. (2019) Dual microglia effects on blood brain barrier permeability induced by systemic inflammation, *Nat. Commun.*, **10**, 5816, doi: 10.1038/s41467-019-13812-z.
  69. Winkler, E. A., Sagare, A. P., and Zlokovic, B. V. (2014) The pericyte: a forgotten cell type with important implications for Alzheimer's disease? *Brain Pathol.*, **24**, 371-386, doi: 10.1111/bpa.12152.
  70. Salmina, A. B., Komleva, Y. K., Lopatina, O. L., and Birbrair, A. (2019) Pericytes in Alzheimer's disease: novel clues to cerebral amyloid angiopathy pathogenesis, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1147**, 147-166, doi: 10.1007/978-3-030-16908-4\_7.
  71. Stone, N. L., England, T. J., and O'Sullivan, S. E. (2019) A novel transwell blood brain barrier model using primary human cells, *Front. Cell Neurosci.*, **13**, doi: 10.3389/fncel.2019.00230.
  72. Salmina, A. B., Gorina, Y. V., Erofeev, A. I., Balaban, P. M., Bezprozvanny, I. B., and Vlasova, O. L. (2021)

- Optogenetic and chemogenetic modulation of astroglial secretory phenotype, *Rev. Neurosci.*, doi: 10.1515/revneuro-2020-0119.
73. Xu, L., Nirwane, A., and Yao, Y. (2018) Basement membrane and blood-brain barrier, *Stroke Vasc. Neurol.*, **4**, 78-82, doi: 10.1136/svn-2018-000198.
74. Thomsen, M. S., Routhé, L. J., and Moos, T. (2017) The vascular basement membrane in the healthy and pathological brain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **37**, 3300-3317, doi: 10.1177/0271678x17722436.
75. Thomsen, M. S., Birkelund, S., Burkhart, A., Stensballe, A., and Moos, T. (2017) Synthesis and deposition of basement membrane proteins by primary brain capillary endothelial cells in a murine model of the blood-brain barrier, *J. Neurochem.*, **140**, 741-754, doi: 10.1111/jnc.13747.
76. Kanda, H., Shimamura, R., Koizumi-Kitajima, M., and Okano, H. (2019) Degradation of extracellular matrix by matrix metalloproteinase 2 is essential for the establishment of the blood-brain barrier in *Drosophila*, *iScience*, **16**, 218-229, doi: 10.1016/j.isci.2019.05.027.
77. Muri, L., Leppert, D., Grandgirard, D., and Leib, S. L. (2019) MMPs and ADAMs in neurological infectious diseases and multiple sclerosis, *Cell. Mol. Life Sci.*, **76**, 3097-3116, doi: 10.1007/s00018-019-03174-6.
78. Ferro, M. P., Heilshorn, S. C., and Owens, R. M. (2020) Materials for blood brain barrier modeling *in vitro*, *Mater. Sci. Eng. R Rep.*, **140**, 100522, doi: 10.1016/j.mser.2019.100522.
79. Blanchette, M., and Daneman, R. (2015) Formation and maintenance of the BBB, *Mech. Dev.*, **138**, 8-16, doi: 10.1016/j.mod.2015.07.007.
80. Saili, K. S., Zurlinden, T. J., Schwab, A. J., Silvín, A., Baker, N. C., et al. (2017) Blood-brain barrier development: Systems modeling and predictive toxicology, *Birth Defects Res.*, **109**, 1680-1710, doi: 10.1002/bdr2.1180.
81. Ruzaeva, V. A., Morgun, A. V., Khilazheva, E. D., Kuvacheva, N. V., Pozhilenkova, E. A., et al. (2016) Development of blood-brain barrier under the modulation of HIF activity in astroglial neuronal cells *in vitro*, *Biomed. Khim.*, **62**, 664-669, doi: 10.18097/pbmc201662066664.
82. Biron, K. E., Dickstein, D. L., Gopaul, R., and Jefferies, W. A. (2011) Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's disease, *PLoS One*, **6**, e23789, doi: 10.1371/journal.pone.0023789.
83. Verheggen, I. C. M., de Jong, J. J. A., van Boxel, M. P. J., Gronenschild, E. H. B. M., Palm, W. M., et al. (2020) Increase in blood-brain barrier leakage in healthy, older adults, *GeroScience*, **42**, 1183-1193, doi: 10.1007/s11357-020-00211-2.
84. Skultéyová, I., Tokarev, D., and Jezová, D. (1998) Stress-induced increase in blood-brain barrier permeability in control and monosodium glutamate-treated rats, *Brain Res. Bull.*, **45**, 175-178, doi: 10.1016/s0361-9230(97)00335-3.
85. Xu, G., Li, Y., Ma, C., Wang, C., Sun, Z., et al. (2019) Restraint stress induced hyperpermeability and damage of the blood-brain barrier in the amygdala of adult rats, *Front. Mol. Neurosci.*, **12**, 32-32, doi: 10.3389/fnmol.2019.00032.
86. Lee, S., Kang, B.-M., Kim, J., Min, J., Kim, H., et al. (2018) Real-time *in vivo* two-photon imaging study reveals decreased cerebro-vascular volume and increased blood-brain barrier permeability in chronically stressed mice, *Sci. Rep.*, **8**, doi: 10.1038/s41598-018-30875-y.
87. Semyachkina-Glushkovskaya, O., Esmat, A., Bragin, D., Bragina, O., Shirokov, A. A., et al. (2020) Phenomenon of music-induced opening of the blood-brain barrier in healthy mice, *Proc. Biol. Sci.*, **287**, 20202337-20202337, doi: 10.1098/rspb.2020.2337.
88. Malinovskaya, N. A., Morgun, A. V., Lopatina, O. L., Panina, Y. A., Volkova, V. V., et al. (2018) Early life stress: consequences for the development of the brain, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **48**, 233-250, doi: 10.1007/s11055-018-0557-9.
89. Lopatina, O. L., Panina, Y. A., Malinovskaya, N. A., and Salmina, A. B. (2021) Early life stress and brain plasticity: from molecular alterations to aberrant memory and behavior, *Rev. Neurosci.*, **32**, 131-142, doi: 10.1515/revneuro-2020-0077.
90. Morgun, A. V., Kuvacheva, N. V., Khilazheva, E. D., Pozhilenkova, E. A., Gorina, Y. V., et al. (2016) Perinatal brain injury is accompanied by disturbances in expression of SLC protein superfamily in endothelial cells of hippocampal microvessels, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **161**, 770-774, doi: 10.1007/s10517-016-3506-z.
91. Kuvacheva, N. V., Morgun, A. V., Malinovskaya, N. A., Gorina, Y. V., Khilazheva, E. D., et al. (2016) Tight junction proteins of cerebral endothelial cells in early postnatal development, *Cell Tissue Biol.*, **10**, 372-377, doi: 10.1134/s1990519x16050084.
92. Sweeney, M. D., Sagare, A. P., and Zlokovic, B. V. (2018) Blood-brain barrier breakdown in Alzheimer disease and other neurodegenerative disorders, *Nat. Rev. Neurol.*, **14**, 133-150, doi: 10.1038/nrneuro.2017.188.
93. Zeppenfeld, D. M., Simon, M., Haswell, J. D., D'Abreo, D., Murchison, C., et al. (2017) Association of perivascular localization of aquaporin-4 with cognition and Alzheimer's disease in aging brains, *JAMA Neurol.*, **74**, 91-99, doi: 10.1001/jamaneuro.2016.4370.
94. Parodi-Rullán, R., Sone, J. Y., and Fossati, S. (2019) Endothelial mitochondrial dysfunction in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Disease*, **72**, 1019-1039, doi: 10.3233/jad-190357.
95. Gorina, Y., Salmina, A., Kuvacheva, N., Komleva, Y., Fedyukovich, L., et al. (2014) Neuroinflammation and insulin resistance in Alzheimer's disease, *Sib. Med. Rev.*, **11-19**, doi: 10.20333/25000136-2014-4-11-19.
96. Thériault, P., ElAli, A., and Rivest, S. (2015) The dynamics of monocytes and microglia in Alzheimer's disease, *Alzheimer's Res. Ther.*, **7**, 41, doi: 10.1186/s13195-015-0125-2.
97. Kyrtos, C. R., and Baras, J. S. (2015) Modeling the role of the glymphatic pathway and cerebral blood vessel properties in Alzheimer's disease pathogenesis, *PLoS One*, **10**, e0139574, doi: 10.1371/journal.pone.0139574.
98. Jia, Y., Wang, N., Zhang, Y., Xue, D., Lou, H., and Liu, X. (2020) Alteration in the function and expression of SLC and ABC transporters in the neurovascular unit in Alzheimer's disease and the clinical significance, *Aging Dis.*, **11**, 390-404, doi: 10.14336/ad.2019.0519.
99. Sekhar, G. N., Fleckney, A. L., Boyanova, S. T., Rupawala, H., Lo, R., et al. (2019) Region-specific blood-brain barrier transporter changes leads to increased sensitivity to amisulpride in Alzheimer's disease, *Fluids Barriers CNS*, **16**, 38, doi: 10.1186/s12987-019-0158-1.
100. Zoufal, V., Wanek, T., Krohn, M., Mairinger, S., Filip, T., et al. (2020) Age dependency of cerebral P-glycoprotein function in wild-type and APPS1 mice measured with PET, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **40**, 150-162, doi: 10.1177/0271678x18806640.
101. Sagare, A. P., Bell, R. D., and Zlokovic, B. V. (2013) Neurovascular defects and faulty amyloid- $\beta$  vascular clearance in Alzheimer's disease, *J. Alzheimer's Dis.*, **33 Suppl 1**, S87-100, doi: 10.3233/jad-2012-129037.
102. Wardlaw, J. M., Makin, S. J., Valdés Hernández, M. C., Armitage, P. A., Heye, A. K., et al. (2017) Blood-brain barrier failure as a core mechanism in cerebral small vessel disease and dementia: evidence from a cohort study, *Alzheimer's Dement.*, **13**, 634-643, doi: 10.1016/j.jalz.2016.09.006.
103. Nation, D. A., Sweeney, M. D., Montagne, A., Sagare, A. P., D'Orazio, L. M., et al. (2019) Blood-brain barrier breakdown is an early biomarker of human cognitive dysfunction, *Nat. Med.*, **25**, 270-276, doi: 10.1038/s41591-018-0297-y.
104. Montagne, A., Barnes, S. R., Sweeney, M. D., Halliday, M. R., Sagare, A. P., et al. (2015) Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus, *Neuron*, **85**, 296-302, doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.032.

105. Desai Bradaric, B., Patel, A., Schneider, J. A., Carvey, P. M., and Hendey, B. (2012) Evidence for angiogenesis in Parkinson's disease, incidental Lewy body disease, and progressive supranuclear palsy, *J. Neural Transm. (Vienna)*, **119**, 59-71, doi: 10.1007/s00702-011-0684-8.
106. Lim, R. G., Quan, C., Reyes-Ortiz, A. M., Lutz, S. E., Kedaigle, A. J., et al. (2017) Huntington's disease iPSC-derived brain microvascular endothelial cells reveal WNT-mediated angiogenic and blood-brain barrier deficits, *Cell Rep.*, **19**, 1365-1377, doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.021.
107. Pan, Y., and Nicolazzo, J. A. (2018) Impact of aging, Alzheimer's disease and Parkinson's disease on the blood-brain barrier transport of therapeutics, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **135**, 62-74, doi: 10.1016/j.addr.2018.04.009.
108. Chaves, C., Do, T. M., Cegarra, C., Roudières, V., Tolou, S., et al. (2020) Non-human primate blood-brain barrier and *in vitro* brain endothelium: from transcriptome to the establishment of a New model, *Pharmaceutics*, **12**, doi: 10.3390/pharmaceutics12100967.
109. Wevers, N. R., Kasi, D. G., Gray, T., Wilschut, K. J., Smith, B., et al. (2018) A perfused human blood-brain barrier on-a-chip for high-throughput assessment of barrier function and antibody transport, *Fluids Barriers CNS*, **15**, 23, doi: 10.1186/s12987-018-0108-3.
110. Lee, S., Chung, M., and Li Jeon, N. (2018) 3D brain angiogenesis model to reconstitute maturation of functional human blood-brain barrier *in vitro*, *bioRxiv*, 471334, doi: 10.1101/471334.
111. Qian, T., Maguire, S. E., Canfield, S. G., Bao, X., Olson, W. R., et al. (2017) Directed differentiation of human pluripotent stem cells to blood-brain barrier endothelial cells, *Sci. Adv.*, **3**, e1701679, doi: 10.1126/sciadv.1701679.
112. Hartlaub, A. M., McElroy, C. A., Maitre, N. L., and Hester, M. E. (2019) Modeling human brain circuitry using pluripotent stem cell platforms, *Front. Pediatr.*, **7**, doi: 10.3389/fped.2019.00057.
113. Grifno, G. N., Farrell, A. M., Linville, R. M., Arevalo, D., Kim, J. H., et al. (2019) Tissue-engineered blood-brain barrier models via directed differentiation of human induced pluripotent stem cells, *Sci. Rep.*, **9**, 13957-13957, doi: 10.1038/s41598-019-50193-1.
114. Huh, D., Leslie, D. C., Matthews, B. D., Fraser, J. P., Jurek, S., et al. (2012) A human disease model of drug toxicity-induced pulmonary edema in a lung-on-a-chip microdevice, *Sci. Transl. Med.*, **4**, 159ra147, doi: 10.1126/scitranslmed.3004249.
115. Kortagere, S., Chekmarev, D., Welsh, W. J., and Ekins, S. (2008) New predictive models for blood-brain barrier permeability of drug-like molecules, *Pharm. Res.*, **25**, 1836-1845, doi: 10.1007/s11095-008-9584-5.
116. Wang, Z., Yang, H., Wu, Z., Wang, T., Li, W., Tang, Y., and Liu, G. (2018) *In silico* prediction of blood-brain barrier permeability of compounds by machine learning and resampling methods, *ChemMedChem*, **13**, 2189-2201, doi: 10.1002/cmde.201800533.
117. DeStefano, J. G., Jamieson, J. J., Linville, R. M., and Searson, P. C. (2018) Benchmarking *in vitro* tissue-engineered blood-brain barrier models, *Fluids Barriers CNS*, **15**, 32, doi: 10.1186/s12987-018-0117-2.
118. Elbakary, B., and Badhan, R. K. S. (2020) A dynamic perfusion based blood-brain barrier model for cytotoxicity testing and drug permeation, *Sci. Rep.*, **10**, 3788, doi: 10.1038/s41598-020-60689-w.
119. Buchroithner, B., Mayr, S., Hauser, F., Priglinger, E., Stangl, H., et al. (2021) Dual channel microfluidics for mimicking the blood-brain barrier, *ACS Nano*, doi: 10.1021/acsnano.0c09263.
120. Miranda-Azpiazu, P., Panagiotou, S., Jose, G., and Saha, S. (2018) A novel dynamic multicellular co-culture system for studying individual blood-brain barrier cell types in brain diseases and cytotoxicity testing, *Sci. Rep.*, **8**, 8784, doi: 10.1038/s41598-018-26480-8.
121. Campisi, M., Shin, Y., Osaki, T., Hajal, C., Chiono, V., and Kamm, R. D. (2018) 3D self-organized microvascular model of the human blood-brain barrier with endothelial cells, pericytes and astrocytes, *Biomaterials*, **180**, 117-129, doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.014.

## BLOOD–BRAIN BARRIER BREAKDOWN IN STRESS AND NEURODEGENERATION: BIOCHEMICAL MECHANISMS AND NEW MODELS FOR TRANSLATIONAL RESEARCH

### Review

**A. B. Salmina<sup>1,2\*</sup>, Yu. K. Komleva<sup>2</sup>, N. A. Malinovskaya<sup>2</sup>, A. V. Morgun<sup>2</sup>, E. A. Teplyashina<sup>2</sup>,  
O. L. Lopatina<sup>2</sup>, Ya. V. Gorina<sup>2</sup>, E. V. Kharitonova<sup>2</sup>, E. D. Khilazheva<sup>2</sup>, and A. N. Shuvaev<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Brain Research Department, Scientific Center of Neurology, 125367 Moscow, Russia

<sup>2</sup> Research Institute of Molecular Medicine and Pathobiochemistry, Krasnoyarsk State Medical University named after Prof. V. F. Voino-Yasenetsky, 660022 Krasnoyarsk, Russia; E-mail: allasalmina@mail.ru

The blood-brain barrier (BBB) is a structural and functional element of the neurovascular unit (NVU), which includes cells of neuronal, glial and endothelial nature. Among the main tasks of NVU functioning are maintaining the control of metabolism and chemical homeostasis in the brain tissue, ensuring adequate blood flow in active regions, regulating neuroplasticity processes, which is reflected in the implementation of intercellular interactions in normal conditions, under stress, neurodegeneration, neuroinfection, neurodevelopmental diseases. Current versions of the BBB and NVU models, static and dynamic, have significantly expanded the research capabilities, but a number of issues remain unresolved, in particular, the personification of models for a patient. In addition, the application of both static and dynamic models has an important problem associated with the difficulty in reproducing the pathophysiological mechanisms responsible for the damage of the structural and functional integrity of the barrier in diseases of the central nervous system. Solving the problem requires more knowledge about the cellular and molecular mechanisms of BBB and NVU damage in pathology. This review discusses the current state of the cellular and molecular mechanisms that control the BBB permeability, the pathobiochemical mechanisms and manifestations of BBB breakdown in stress and neurodegenerative diseases, as well as the problems and prospects of creating *in vitro* BBB and NVU models for translational studies in neurology and neuropharmacology. Deciphering BBB (patho)physiology will give us new opportunities for the development of regenerative medicine, neuropharmacology and neurorehabilitation.

**Keywords:** brain, blood-brain barrier, stress, neurodegeneration

УДК 616.895.8-07+612.616.31-092+616-008.6+616.89

## МОНОАМИНОКСИДАЗА КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ БИОЛОГИЧЕСКИЙ МАРКЕР ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРАПИИ ПСИХИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

### Обзор

© 2021 М.Г. Узбекиков

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

Поступила в редакцию 05.03.2021

После доработки 05.05.2021

Принята к публикации 07.05.2021

В обзоре обобщены результаты собственных исследований и литературные данные по поиску биологических маркеров психических заболеваний. Активность моноаминоксидазы тромбоцитов рассматривается в качестве потенциального биомаркера этих заболеваний. Исследование пациентов с тревожной депрессией и первым эпизодом шизофрении в процессе фармакотерапии показало, что активность моноаминоксидазы тромбоцитов может служить потенциальным биомаркером эффективности терапии этих расстройств.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** моноаминоксидаза тромбоцитов, биомаркер, системный подход, тревожная депрессия, первый эпизод шизофрении, фармакотерапия.

DOI: 10.31857/S0320972521060142

### ВВЕДЕНИЕ

Биологические маркеры – это биохимические, физиологические или анатомические параметры, специфичные для определенного состояния или болезни. Важнейшей целью биомаркеров является обнаружение коррелятов заболевания, которые могут быть использованы в качестве диагностических инструментов.

Понимание молекулярных процессов при психической патологии является фундаментальным требованием для разработки диагностических, дифференциально-диагностических и прогностических методов, а также эффективной терапии высокого уровня. Биомаркеры, выделенные из свободно доступных жидкостей организма (спинно-мозговая жидкость, сыворотка или плазма крови, моча или слюна) могут помочь идентификации субтипов болезни, способствовать прогнозу и мониторингу ответа на лечение, степени комплаентности к лечению. Кроме того, биомаркеры дают возможность обнаружения мишеней фармакологических препаратов, что является важным не только при создании лекарственных средств с заданными свойствами, но

также может быть использовано при разработке новых терапевтических подходов. Идентификация биологических маркеров способствует углубленному пониманию патогенеза заболевания и его патофизиологических механизмов [1, 2].

Согласно данным литературы, существует несколько классификаций биомаркеров. Одна из наиболее удобных, по нашему мнению, разработана Lopresti et al. [3]. Авторы предлагают следующую классификацию:

– диагностические биомаркеры, которые используются для подтверждения наличия или отсутствия заболевания;

– терапевтические биомаркеры, способствующие выбору оптимального лечения для конкретного больного;

– биомаркеры эффективности проводимой терапии;

– прогностические биомаркеры, прогнозирующие течение заболевания.

Для определения патофизиологических механизмов психических заболеваний, выявления нарушений метаболических процессов, а также для базирующейся на этих данных разработки фармакологических препаратов с новыми свойствами и мишенями необходима информация о подлежащих нейробиохимических процессах. С целью ее получения проводят биохимические исследования (имеется в виду биохимия самого широко-

Принятые сокращения: MAO – моноаминоксидаза; ПЭШ – первый эпизод шизофрении; R1 – фактор, ингибирующий транскрипцию гена MAOB; Sp1 – транскрипционный фактор Sp1 (simian virus 40 promoter factor 1).

го плана). В понимание патогенетических механизмов этих заболеваний в последние годы значительный вклад вносят генетические исследования, которые могут выявить конкретные нарушения на геномном, хромосомном и генном уровне.

Таким образом, патогенетические и патофизиологические механизмы психических заболеваний возможно в значительной степени изучить и уяснить сочетанным проведением генетических и биохимических исследований. Определение биомаркеров применяется в разных областях клинической медицины, таких как сердечно-сосудистые заболевания, поражения печени и ряд других. Однако в психиатрии на настоящий момент не существует ни одного биомаркера, который был бы внедрен в клиническую практику [4, 5].

В этом плане применение системного подхода может привести к прогрессу в биологической психиатрии [2, 6, 7]. Полученные при использовании системного подхода (в отличие от редуционистского) данные указывают на очень сложную природу психических расстройств. Эти заболевания являются мультифакторными и характеризуются генетическими и средовыми взаимоотношениями, вызывающими как клеточные, так и структурные изменения на нейрональном уровне. Таким образом, диагностика психических заболеваний должна проводиться в совокупности всех различных компонентов таких расстройств [2]. Клинические проявления психических расстройств обычно являются результатом влияния различных генов совместно с множеством эпигенетических механизмов [8].

В настоящее время улучшается понимание сложности психических расстройств, неадекватности существующих диагностических, прогностических и терапевтических подходов, в частности, отсутствия специфичных тому или иному заболеванию молекулярных биомаркеров. Сложность психических расстройств связана с высоким уровнем этиологической гетерогенности и вовлечением множества мультифакторных (средовых и генетических) эффектов [9, 10].

Тем не менее изучение психических расстройств связано со множеством ограничений. Они включают в себя отсутствие доступа к тканям мозга, взаимное перекрывание симптомов, что может приводить к диагностической неопределенности и невозможности идентифицировать специфические диагностические биомаркеры при помощи современных визуализационных методов, таких как функциональная магнитно-резонансная томография (фМРТ), позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) и другие [9].

Современные молекулярно-биологические подходы могут способствовать более точной и объективной диагностике заболевания, а это, в свою очередь, создает базу для развития таргетной персонализированной терапии. Применяемые ранее молекулярно-биологические методы, при которых исследовался эффект одного гена или одного белка, уже не являются достаточными для понимания психических расстройств [2, 7]. Такие редуционистские подходы не дают возможности «заглянуть внутрь» структуры и динамики биологической системы, какой является организм млекопитающих, включая и человека.

Редуционистский подход ограничивает наше понимание компенсаторных и адаптационных ответов биологической системы в отношении всевозможных внешних и, вероятно, также и внутренних воздействий. Системный подход способствует оценке мультифакторных аспектов психических заболеваний для уяснения патогенетических и патофизиологических механизмов этих расстройств.

Данные литературы свидетельствуют в пользу того, что при депрессиях в большей степени поражается пять биологических систем – нейромедиаторная, нейроэндокринная, нейротрофическая, метаболическая и цитокиновая, которые в конечном счете являются основными источниками потенциальных биомаркеров [11].

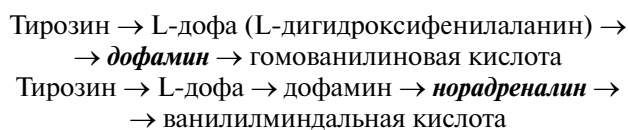
Согласно доступным нам данным, исследования, связанные с изучением активности ферментов нейромедиаторного обмена у пациентов с психическими заболеваниями, являются единичными.

В настоящей работе мы поставили целью рассмотреть роль одного из основных ферментов моноаминергического обмена, моноаминоксидазы (МАО), как потенциального биомаркера психических заболеваний.

## МОНОАМИНОКСИДАЗА

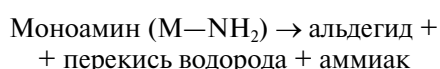
Одним из ферментов, представляющих интерес для психиатров, является моноаминоксидаза. Она служит основным звеном, осуществляющим инактивацию биологически активных моноаминов – нейромедиаторов и нейромодуляторов.

На схеме представлены основные пути синтеза и деградации (метаболизма) важнейших биологически активных моноаминов (выделены курсивом и жирным шрифтом):



Триптофан → 5-окситриптофан → *серотонин*  
(5-окситриптамин) → 5-оксииндолуксусная кислота

Моноаминоксидазы являются митохондриальными ферментами, которые катализируют окислительное дезаминирование ароматических моноаминов. Субстратами MAO являются биогенные моноамины: индолалкиламины (серотонин и триптамин), катехоламины (дофамин и норадреналин), следовые амины (бета-фенилэтиламин, тирамин и октопамин), а также моноамины, поступающие с пищей, и ряд других соединений. В реакциях, катализируемых MAO, образуются такие токсические реакционно-активные соединения, как альдегиды, аммиак, а также перекись водорода:



В настоящее время охарактеризованы два различных типа MAO: MAO-A и MAO-B. Различия между этими изоформами, еще до определения их молекулярных характеристик, были выявлены на основании субстратной и ингибиторной чувствительности. Было установлено, что MAO-A проявляет большее сродство в отношении серотонина и норадреналина и необратимо ингибируется хлоргидрином. MAO-B проявляет большее сродство к фенилэтиламину и бензиламину, ее селективным ингибитором является депренил. Обе изоформы MAO с одинаковой активностью дезаминируют дофамин. Молекулярный вес обеих изоформ фермента также близок: MAO-A – 59,7 кДа, MAO-B – 58,0 кДа [12].

Первичная структура MAO-A и MAO-B идентична на 70% и содержит пентапептидную последовательность (Ser-Gly-Gly-Cys-Tyr), к которой присоединяется флавиновый кофактор путем образования тиоэфирной ковалентной связи с остатком цистеина [13].

Существование двух изоформ с различной молекулярной структурой было подтверждено при клонировании ДНК генов MAO-A и MAO-B. Оба гена расположены на хромосоме X (локус Xp11.23) и состоят из 15 экзонов. Экзон-интронная организация генов, кодирующих MAO-A и MAO-B (*MAOA* и *MAOB* соответственно), идентична. В совокупности это указывает на то, что эти два гена происходят путем дубликации общего анцестрального гена [14]. Подробное освещение проблем ферментативного катализа и анализ результатов генетических исследований моноаминоксидаз не являлись целью нашей работы; эти вопросы достаточно подробно представлены в ряде публикаций [12, 15–18].

Различия между изоформами моноаминоксидазы также подтверждаются данными о том, что MAO-A и MAO-B активируются и репрессируются различными транскрипционными факторами [18]. Кроме того, обе формы фермента экспрессируются практически во всех периферических органах и тканях, однако MAO-A содержится преимущественно в фибробластах и плаценте, тогда как MAO-B является единственной изоформой в тромбоцитах и лимфоцитах [12]. Известно также, что серотонинергические нейроны ядра шва содержат преимущественно MAO-B, в то время как норадренергические нейроны голубого пятна (*locus ceruleus*) экспрессируют преимущественно MAO-A [12].

В головном мозге человека с подросткового возраста до старости MAO-B экспрессируется более активно, чем MAO-A; однако в мозге плодов это отношение носит обратный характер [19]. MAO-A Vt (total distribution volume), индекс плотности белка MAO-A, можно измерить в мозге человека *in vivo* при помощи позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) с использованием [<sup>11</sup>C]-гармина [20–22]. Содержание MAO-A определяли в различных областях головного мозга: префронтальная кора, передняя и задняя области цингулярной коры, хвостатое ядро, базальные ядра, таламус, передняя височная кора, средний мозг, гиппокамп и окологиппокампальные структуры. На основании результатов проведенных исследований авторы сделали предположение, что плотность (содержание) белка MAO-A в мозговой ткани высоко коррелирует с активностью MAO-A [19, 21].

Также было выявлено, что уровень MAO-B достоверно выше уровня MAO-A во всех исследованных областях мозга при соотношении MAO-B к MAO-A от 2,6 (затылочная кора) до 17,8 (мозолистое тело) [19].

Tong et al. на основании своих исследований высказали предположение, что ферментативная активность и концентрация обоих белков коррелируют друг с другом [19]. Тем не менее этот тезис вызывает определенные сомнения, так как активность ферментов непосредственно в мозге человека *in vivo* исследовать невозможно, а содержание белка не всегда является показателем активности этого фермента. Вероятно, в нормальных условиях (в здоровом организме) такую возможность можно принять. В условиях же патологии такое положение, как мы сказали выше, является сомнительным. В подтверждение можно привести наши собственные данные по изучению конформации альбумина: при одном и том же содержании альбумина у здоровых и больных с первым эпизодом шизофрении, антиоксидантная активность альбумина у пациен-

тов во второй группе была достоверно снижена [23].

Прямое исследование активности МАО в ткани головного мозга человека не представляется возможным, однако в биологической психиатрии сформировалась гипотеза «периферических моделей центральной нервной системы» [24]. Согласно этой гипотезе, ферменты, рецепторы и другие биохимические компоненты форменных элементов крови в значительной степени отражают особенности состояния биохимических систем головного мозга. Так, например, тромбоциты, в которых определяется активность МАО, обладают сходными параметрами с препаратами нервных окончаний мозга (синаптосомами) в отношении механизмов активного переноса биогенных моноаминов, образования их резервных форм, функции резервных гранул и рецепторов моноаминов [25].

Впервые МАО была обнаружена в тромбоцитах в 1964 году [26].

Тромбоциты и нейроны имеют различное эмбриональное происхождение: первые образуются из мегакариоцитов, которые происходят из мезодермы, тогда как вторые образуются из эктодермы [27]. Несмотря на различное эмбриональное происхождение, тромбоциты и нейроны проявляют одинаковую реакцию при многих неврологических и психических расстройствах, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, различные формы шизофрении и депрессии [25]. Например, тромбоциты экспрессируют значительное количество APP (amyloid precursor protein); самые высокие концентрации этого белка обнаружены в головном мозге и тромбоцитах [28]. Высказывается гипотеза о том, что изменения в головном мозге при болезни Альцгеймера отражаются и на тромбоцитах [29].

Тромбоциты, как и нейроны, являются компонентами APUD-системы (amine precursor uptake and decarboxylation system) по Пирсу [30]. Тромбоциты, будучи клеточными фрагментами мегакариоцитов, не имеют ядер, однако содержат значительное число митохондрий, плотных гранул для депонирования небольших молекул (ADP и др.),  $\alpha$ -гранул, служащих резервуаром для хранения серотонина, а также секреторных белков. Кроме того, тромбоциты и нейроны обладают активным механизмом для транспорта серотонина, имеют центры связывания нейромедиаторов и лекарственных препаратов, плотные тельца (dense bodies), в которых хранится серотонин, а также экспрессирующие МАО-В митохондрии [25, 29]. Тромбоциты экспрессируют исключительно МАО-В, имеющую при этом ту же аминокислотную последовательность, как и МАО-В головного мозга [31, 32].

## ПСИХИЧЕСКИЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

**Депрессия.** Это заболевание является одним из наиболее распространенных и при этом одной из основных причин потери трудоспособности в мире [33, 34]. Депрессия является самой тяжелой клинической, эмоциональной и социально-экономической нагрузкой на человека и общество в целом. В настоящее время около 300 млн человек по всему миру страдают от депрессии, при этом от 5 до 17% людей в популяции пережили депрессию хотя бы один раз в жизни. В 1999 г. Всемирный Банк на основании инициированного им исследования прогнозировал, что к 2020 г. заболеваемость депрессией возрастет во всех регионах мира, и депрессия выйдет на второе место после сердечно-сосудистых заболеваний среди основных причин нетрудоспособности [35]. По прогнозу Всемирной организации здравоохранения (анализ был проведен в 2012 г.), к 2030 г. депрессия будет ведущей причиной инвалидизации в мире [36]. В реальности уже к концу 2000-х гг. депрессии стали основной причиной нетрудоспособности в Европе [37].

Депрессия также является фактором риска многих серьезных соматических заболеваний [34]. Она усугубляет их течение и создает риск развития осложнений и преждевременной смерти [38]. Депрессии превратились в большую медико-социальную проблему, которая в ближайшие годы будет только обостряться, поэтому всестороннее исследование депрессии, в частности ее патогенетических механизмов, становится одной из главных задач медицинской науки. Прогнозирование и оценка эффективности лечения депрессии по важности выдвигаются на первый план.

Пациенты, страдающие депрессией и тревожным расстройством, патогенетические механизмы которых тесно переплетены, представляют собой особый случай с необходимостью выбора препаратов, обладающих как тимоаналептическим (антидепрессивным), так и выраженным анксиолитическим (противотревожным) действием [38].

Внедрение в клиническую практику антидепрессантов с избирательным спектром действия на серотонинергическую систему, ингибиторов или активаторов обратного захвата серотонина, может значительно повысить эффективность лечения больных и улучшить качество их жизни. Однако это требует дополнительного изучения нейробиохимических механизмов действия того или иного препарата, уточнения показаний к их применению, а также исследования клинической и метаболической картины в процессе лечения.

Нами проведено исследование больных с тревожной депрессией. Состояние пациентов в



соответствии с МКБ-10 (Международная классификация болезней 10-го пересмотра) оценивалось как депрессивный эпизод в качестве самостоятельного заболевания (F32.1) и в структуре рекуррентного депрессивного расстройства (F33.1). Основным признаком для включения в исследование было преобладание в структуре депрессии тревожного аффекта.

Использование специального комплекса биохимических и нейробиохимических показателей, разработанного в лаборатории патологии мозга Московского НИИ психиатрии [39, 40], позволило выявить у больных с тревожной депрессией значительные нарушения нейромедиаторного моноаминергического обмена.

До начала терапии средний балл по шкале Гамильтона для оценки депрессии (HDRS) среди пациентов составлял 21,8, что соответствовало депрессии тяжелой степени, среднее значение по шкале Гамильтона для оценки тревоги (HARS) составило 18,4 балла, что соответствовало умеренно выраженной тревоге [41].

До начала лечения активность MAO тромбоцитов у больных была достоверно повышена в среднем почти в 2 раза по сравнению с контрольной группой (на 94%; 16,91 против 8,68 нмоль бензальдегида/мг белка в час соответственно). Следует отметить, что в плазме также содержится семикарбазид-чувствительная аминоксидаза (CAO), которая может интерферировать с MAO-B тромбоцитов, поэтому выделению тромбоцитов мы уделяли особое внимание [39, 40]. После выделения из плазмы фракции тромбоцитов, последняя была суспендирована в солевом растворе и дважды отцентрифугирована для получения высокой степени очистки.

Кроме того, у больных уровень кортизола в сыворотке крови был повышен более чем в 10 раз по сравнению с верхней границы нормы: 306 против 30,2 мкг/дл соответственно.

Антидепрессивная фармакотерапия тианептином способствовала достоверному улучшению состояния пациентов: к 14 дню терапии средний балл по HDRS составил 18,0, по HARS – 13,1. Через 2 недели терапии тианептином на фоне улучшения клинического статуса было установлено снижение средней активности MAO тромбоцитов на 10% по сравнению с активностью фермента до начала лечения [40]. В 2017 г. наши результаты были подтверждены в работе Zeb et al. [42]. Авторы установили, что у больных депрессией до начала лечения активность MAO тромбоцитов была повышена в среднем на 25% по сравнению с контрольной группой. Через 2 недели терапии антидепрессантом флуоксетином активность MAO достоверно снизилась на 20%.

Подтверждение наших результатов о повышении активности MAO тромбоцитов (MAO-B) при депрессии было получено в работах группы Meyer et al. [43, 44]. Для определения плотности (содержания) MAO-B в головном мозге больных, страдающих депрессией, была применена ПЭТ высокого разрешения с использованием специфического меченого лиганда MAO [ $^{11}\text{C}$ ]SL25.1188([ $^{11}\text{C}$ ]-5-метоксиметил-3-[6-(4,4,4-трифлуоробутоксид)-бензо/d/изоксазол-3-ил]-оксазолидин-2-[ $^{11}\text{C}$ ]он]) ([ $^{11}\text{C}$ ]SL25.1188 ([ $^{11}\text{C}$ ]-5-methoxymethyl-3-[6-(4,4,4-trifluorobutoxy)-benzo/d]isoxazol-3-yl]-oxazolidin-2-[ $^{11}\text{C}$ ]one)) [43]. Таким методом было установлено, что MAO-B Vt при депрессии был повышен в среднем на 26% практически во всех корковых отделах головного мозга по сравнению с контрольной группой. Различия между пациентами и контрольной группой были особенно выражены в отделах коры, расположенных проксимально по отношению к вентролатеральному отделу префронтальной коры, и в таламусе. Авторы полагают, что чем длительнее человек страдает депрессией, тем более высокая плотность (содержание) MAO-B обнаруживается в коре головного мозга: вентролатеральной, дорсолатеральной, орбитофронтальной, внутренней париетальной, височной и затылочной областях коры, а также в таламусе [44].

Таким образом, анализ результатов нашей работы [40] и исследования Meyer et al. [44] показал, что существует прямая корреляция между активностью тромбоцитарной MAO (MAO-B) и плотностью белка MAO-B в головном мозге больных депрессией. Суммируя результаты вышеприведенных работ, мы считаем, что тромбоциты действительно являются «окном в головной мозг» [24].

Ситуация с исследованием MAO-A обстоит по-другому. Содержание MAO-A также оценивалось по индексу плотности белка. Исследование мозга человека *in vivo* было проведено с использованием ПЭТ с [ $^{11}\text{C}$ ]-гармином в качестве лиганда белка [20–22]. [ $^{11}\text{C}$ ]-Гармин обладает не только высоким ( $K_i = 2 \text{ нМ}$ ), но и избирательным сродством к ферменту MAO-A. Было выявлено, что у пациентов с депрессией MAO-A Vt был повышен во всех отделах мозга в среднем на 34% [19, 21]. На основании результатов проведенных исследований, авторы высказывают предположение, что в мозговой ткани плотность (содержание) белка MAO-A высоко коррелирует с активностью MAO-A [19, 21].

Следует подчеркнуть, что отсутствие исследований и, соответственно, данных по изменению плотности белка MAO-A в динамике фармакотерапии является большим недостатком этих работ.

Каков же механизм повышения уровня белка MAO-A при депрессии? В нормальных условиях белок CDCA7L (cell division cycle-associated 7-like protein, он же белок R1) репрессирует транскрипцию гена MAOA путем взаимодействия с сайтом связывания транскрипционного фактора Sp1 (simian virus 40 promoter factor 1) в промоторе гена. Этот процесс регулирует биосинтез фермента MAO-A и поддерживает его баланс с другими компонентами клетки [45]. Однако при депрессии наблюдается иная картина [46]. Johnson et al. провели постмортальное исследование мозга пациентов с депрессией, при этом были выделены 2 группы – пациенты, не получавшие терапию (нелеченые), и пациенты, которым проводилась антидепрессивная терапия (леченые больные). В головном мозге было измерено содержание белка R1 и MAO-A, а также каталитическая (ферментативная) активность MAO-A. Авторы показали, что определение каталитической активности MAO-A в постмортальном мозге человека является специфичным и достоверным. По результатам исследования было установлено, что:

- содержание белка R1 было достоверно снижено у нелеченых и леченых больных на 37,5 и 30,3% соответственно по сравнению с контрольной группой. Это означает, что проводимая антидепрессивная терапия не оказывает влияния на содержание белка R1;

- экспрессия белка MAO-A была достоверно повышена в префронтальной коре в среднем на 40% у нелеченых больных и на 39% у леченых больных по сравнению с контролем;

- каталитическая (ферментативная) активность MAO-A в префронтальной коре у леченых больных была повышена на 19%, а у нелеченых – на 24,5% по сравнению с контролем [46].

Интересно отметить, что повышение ферментативной активности было значительно менее выраженным (24%), чем увеличение концентрации белка MAO-A (40%). Эта находка авторов поддерживает высказанное нами ранее положение, что содержание (или плотность) белка не является зеркальным отражением активности фермента.

Таким образом, постмортальное исследование мозга пациентов с депрессией выявило, что уровень белка R1 в префронтальной коре был достоверно снижен по сравнению контролем, что, вероятно, явилось причиной повышения уровня MAO-A и, соответственно, активности этого фермента [46].

Исследования MAO-A, проведенные группой Meyer et al. [21, 46] при помощи ПЭТ с [<sup>11</sup>C]-гармином *in vivo* у пациентов, страдающих депрессией, и на постмортальном мозге пациентов с депрессией, являются информативными и

интересными, однако они носят фундаментальный характер. Эти исследования не имеют клинического смысла, т.к. они не применимы в обычной психиатрической практике. Для клинической практики нужны периферические параметры, отражающие уровень и активность MAO-A в головном мозге, однако до настоящего времени таких периферических параметров в крови не обнаружено. Тем не менее работы группы Meyer et al. могут представлять интерес для фармакологов и химиков в поиске специфических ингибиторов MAO-A.

Нарушение активности моноаминоксидаз влечет за собой целый комплекс метаболических нарушений в головном мозге [47]:

- нарушение обмена моноаминов – нейромедиаторов и нейромодуляторов;

- нарушение баланса между основными моноаминами-нейромедиаторами – дофамином, норадреналином и серотонином;

- нарушение мембранной структуры митохондрий;

- активацию свободнорадикальных реакций (через перекись водорода);

- повышение уровня токсических соединений (альдегид и аммиак).

Более того, избыточная экспрессия MAO-B, сопровождающаяся активацией свободнорадикальных реакций, проявляется нарушением функции митохондрий. При этом снижаются уровни пируватдегидрогеназы, сукцинатдегидрогеназы и митохондриальной аконитазы, а также ингибируется активность митохондриального комплекса I за счет образования дофамина [48]. Подчеркнем, что у больных депрессией отмечено снижение активности митохондриального комплекса I в префронтальной коре [49].

В 2001 г. была выдвинута гипотеза, согласно которой депрессия и тревога контролируются не абсолютными уровнями серотонина и норадреналина, а «балансом» активности этих систем [50], т.е. у больных нарушена регуляция обмена этих моноаминов. Концепция баланса согласуется с тем фактом, что ядра шва, центр серотонинергической системы в головном мозге, и голубое пятно, центр норадренергической системы, являются взаимосвязанными и взаимозависимыми структурами [51].

Мы полагаем, что концепция «баланса», предложенная Kasreg, базируется на положениях, высказанных и экспериментально доказанных профессором Громовой в середине 70-х гг. прошлого столетия. По Громовой [51], серотонинергическая и норадренергическая системы находятся в реципрокных взаимоотношениях, т.е. активация одной системы ведет к торможению другой и

наоборот, а эмоциональная реактивность в значительной мере определяется балансом активности указанных выше систем. Серотонину и норадреналину отводится особая роль в патогенетических механизмах тревоги и депрессии в связи с их модулирующими функциями. Активность этих моноаминергических систем контролируется другими нейромедиаторными системами, например, ГАМКергической [52]. Более того, любой из этих нейромедиаторов может инициировать каскад процессов, вызывающих у пациентов тревогу и постепенно формирующих у них депрессивное состояние [53]. Нарушение регуляции серотонинергической системы (её ингибирование) способствует гиперактивации норадренергической системы, в результате чего может усиливаться депрессивная симптоматика [50].

Изучение биохимических механизмов, задействованных в нарушении баланса между серотонинергической и норадренергической системами, представляет теоретический и практический интерес. Анализ данных клинико-биохимических и экспериментальных исследований, проведенных на моделях депрессии [54], в совокупности с нашими данными позволил нам предложить возможный нейрхимический механизм этих нарушений при тревожной депрессии [55, 56] (рисунок).

Как указывалось выше, тревожная депрессия сопровождается повышенной активностью моноаминоксидазы тромбоцитов, а также повышенным уровнем (секреции) кортизола. Нами была высказана гипотеза о возможном механизме влияния глюкокортикоидов на повышение активности MAO и снижение функциональной активности серотонинергической и норадренергической систем в головном мозге больных [40, 55]. Снижение функциональной активности серотонинергической и норадренергической систем при тревожной депрессии выводит секрецию глюкокортикоидов из-под контроля моноаминергической системы. Это выражается в активации синтеза кортизола (рисунок). Повышенный уровень кортизола при депрессиях [40, 55] активирует фермент триптофанпирролазу, который переводит обмен триптофана (предшественника серотонина) на другие метаболические пути, в частности на кинурениновый путь [57], что вызывает снижение биосинтеза серотонина [58]. С другой стороны, усиленная секреция кортизола повышает активность тирозинтрансаминазы, что может приводить к уменьшению фракции тирозина, идущего на биосинтез катехоламинов, и снижать уровни последних, в частности уровень норадреналина [59].

Весомый вклад в снижение содержания серотонина и норадреналина в головном мозге вно-

сит и моноаминоксидаза. Как указывалось ранее, моноаминоксидаза тромбоцитов отражает активность этого фермента в головном мозге [32]. Можно предположить, что под влиянием высоких уровней кортизола активность MAO может повышаться. Это и было выявлено в нашем исследовании: дезаминирующая активность моноаминоксидазы у больных тревожной депрессией была в среднем повышена ~ в 2 раза по сравнению с контролем. Следует отметить, что MAO дезаминирует серотонин и норадреналин с различной скоростью [16], что при тревожной депрессии может приводить к нарушению баланса между ними.

Какие же тонкие механизмы участвуют в процессах, связанных с повышением активности MAO при депрессиях?

Установлено, что целый ряд нарушений при различных формах депрессии связан с повышенной секрецией глюкокортикоидов [11, 40, 44, 45, 55, 57]. В свою очередь, повышенную экспрессию MAO при депрессиях связывают с повышением секреции глюкокортикоидов [44, 45, 55]. Последние активируют транскрипцию *MAOB* при помощи различных механизмов:

- глюкокортикоиды связываются с глюкокортикоид-респонсивным элементом (glucocorticoid response element 4; GRE4) в промоторе *MAOB* и активируют транскрипцию этого гена [44];

- повышение активности MAO может быть связано со снижением активности транскрипционных факторов EAP (E2F-associated phosphoprotein) и R1 (также обозначаемого как RAM2/CDCA7L/JPO2), в норме ингибирующими транскрипцию *MAOB* путем взаимодействия с сайтами связывания Sp1 в центре промотора *MAOB*. При снижении связывающей активности EAP и R1 и одновременном связывании глюкокортикоидов с GRE4 эндогенный Sp1 способен скоррелированно повышать транскрипцию MAO-B [45, 60];

- глюкокортикоиды стимулируют экспрессию TIEG2 (transforming growth factor- $\beta$ -inducible early gene 2), который взаимодействует с проксимальным участком сайта связывания Sp1, что ведет к усилению транскрипции *MAOB* [61].

Было показано, что в префронтальной коре пациентов с депрессией активность R1 (RAM2/CDCA7L/JPO2), ингибирующего транскрипцию *MAOB* в культуре ткани, снижена, а активность TIEG2, который активирует транскрипцию *MAOB in vitro*, повышена [45, 60]. Мы высказываем предположение, что повышение активности MAO может быть связано с нарушением конформации этого белка. Эта гипотеза базируется на результатах наших исследований, показывающих, что у больных, страдающих и



Гипотетический механизм взаимосвязи моноаминергической и гормональной систем в патогенезе тревожной депрессии по Узбекову М.Г. и Максимовой Н.М. [55, 56]. МАО – моноаминоксидаза; ↑ – повышение активности или содержания; ↓ – снижение активности или содержания

тревожной [62], и меланхолической [63] депрессией, была достоверно нарушена конформация альбумина в сыворотке крови.

Таким образом, одним из важнейших нарушений, происходящих при депрессии, является активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси и избыточная секреция кортизола. Анализ данных литературы позволяет заострить внимание на необходимости включения в комплексную антидепрессивную терапию препаратов, снижающих секрецию глюкокортикоидов [56, 64].

Согласно представленным результатам исследований, активность МАО тромбоцитов может служить потенциальным биомаркером эффективности проводимой антидепрессивной фармакотерапии.

**Первый эпизод шизофрении.** Шизофрения – тяжелое психическое расстройство, выражающееся в форме патологического психического функционирования и поведения. Этим заболеванием страдает приблизительно 1% населения мира. Кардинальные признаки шизофрении включают в себя позитивные (галлюцинации, бред) и негативные (апатия, абulia, эмоциональная и социальная отгороженность) симптомы, а также когнитивные дисфункции и нарушенное социальное функционирование [65]. Заболевание характеризуется различными нарушениями развития и структуры нервной системы, а также аномальным поведением. Предполагается, что такие патологические изменения связаны с нарушением функционирования генетического аппарата и патологическим воздействием различных средовых факторов, способствующих развитию окислительного стресса и повреждению структурных элементов головного мозга [66].

В настоящее время этиология психических заболеваний (шизофрении, депрессии) точно не определена. Проводится много исследований, сфокусированных на идентификации «генов риска» или полиморфизмов, ведущих к развитию психических заболеваний. Тем не менее мутация одного гена не может ясно объяснить фенотип психических расстройств; к тому же, моногенных форм шизофрении или депрессии на данный момент не описано. Полагают, что эти заболевания являются результатом комплексного взаимодействия между генетическими, эпигенетическими и средовыми факторами [8].

В современной медицине значительное внимание уделяется ранней диагностике и своевременной помощи больным с впервые возникшими психотическими состояниями. Целесообразность раннего вмешательства при первом психотическом эпизоде шизофрении обосновывается возможностью ускорения наступления ремиссии, уменьшения социальных потерь, возможностью терапевтического воздействия на начальном этапе болезни с целью снижения нейрокогнитивного дефицита, отмечающегося у таких больных, а также улучшения их качества жизни [65]. Таким образом, задача углубленного изучения патофизиологических механизмов первого эпизода шизофрении (ПЭШ) является одной из приоритетных. Тем не менее наши знания о патогенетических механизмах ПЭШ, несмотря на достаточно интенсивные исследования, все еще остаются фрагментарными [67, 68].

Альтернативным подходом по отношению к генетическим исследованиям является поиск биологических маркеров заболевания – биомаркеров. Однако работ, связанных с изучением биохимических процессов у пациентов с ПЭШ, явно недостаточно, а получаемые результаты являются крайне противоречивыми.

Исходя из известного факта, что у больных шизофренией нарушен моноаминергический обмен, было решено исследовать активность ключевого фермента метаболизма моноаминов, моноаминоксидазы, у больных с ПЭШ. При анализе литературы мы нашли только одну работу [69], в которой было показано, что у больных с ПЭШ активность МАО тромбоцитов не отличалась от таковой у здоровых добровольцев. Согласно другим данным, при хроническом течении шизофрении активность МАО тромбоцитов у больных снижалась [70]. В наших исследованиях у больных с ПЭШ, напротив, было выявлено достоверное почти двукратное повышение активности этого фермента [71]. Анализ данных об обмене моноаминов позволяет сделать предположение о причинах повышенной активности тромбоцитарной МАО у больных с ПЭШ до на-

чала лечения. Так, Laruelle и Abi-Dargham [72] на основании данных ПЭТ- и ОФЭКТ-исследований высказали положение о гиперактивации дофаминергической нейротрансмиссии у больных с ПЭШ, что, естественно, сопровождается усилением выброса дофамина в синаптическую щель. Более того, у больных с ПЭШ было выявлено снижение связывающей активности дофаминового транспортера, ответственного за обратный захват дофамина из синаптической щели в пресинаптическое окончание [73]. Это нарушение также способствует накоплению избыточного дофамина в синаптической щели. Можно полагать, что установленное нами значительное повышение активности MAO у больных с ПЭШ является компенсаторным и направлено на снижение концентрации дофамина в синаптической щели. Этот тезис поддерживается данными исследования [74], в котором у больных с ПЭШ был выявлен достоверно повышенный уровень гомованилиновой кислоты (продукт реакции дезаминирования дофамина, катализируемой MAO) по сравнению с контролем.

Моноаминергические нейромедиаторы, секретируемые в синаптическую щель, после взаимодействия с соответствующими рецепторами захватываются астроцитами, содержащими моноаминоксидазу [6]. В этих клетках происходит химическая инактивация моноаминов, т.е. их дезаминирование. Повышение активности MAO, направленное на снижение повышенного уровня дофамина, в такой ситуации, с одной стороны, является положительным явлением, с другой — несет целый ряд негативных последствий. Так, было установлено достоверное снижение содержания серотонина в тромбоцитах больных с ПЭШ [75]. Это может свидетельствовать как о снижении его синтеза, так и об активации дезаминирования под действием MAO. Таким образом, повышение активности MAO может вести к нарушению баланса между нейромедиаторными моноаминами. Тем не менее нельзя исключить, что нарушение указанного баланса также может быть индуцировано изменением активности компонентов глутаматергической системы [76].

Явления, связанные с повышением активности MAO, могут рассматриваться с нескольких точек зрения. Во-первых, данный факт указывает на нарушение обмена моноаминов. MAO, обладая различным сродством к дофамину и серотонину [16], дезаминирует их с разной скоростью. Можно полагать, что у больных с ПЭШ изменяется не только абсолютная концентрация этих нейромедиаторов в головном мозге, но и баланс между ними, присущий нормальному организму. Во-вторых, известно, что MAO является интегральным компонентом наружной

митохондриальной мембраны. Нарушение активности фермента у больных с ПЭШ может сопровождаться повреждением мембранных структур и появлением в крови токсичных продуктов. В-третьих, повышение активности MAO сопровождается ростом продукции перекиси водорода. Известно, что перекись водорода, образующаяся в реакциях дезаминирования, катализируемых MAO, является основным источником свободных радикалов в головном мозге [77, 78]. Следовательно, увеличение активности MAO у больных с ПЭШ должно активировать свободнорадикальные реакции и процессы перекисного окисления липидов. В-четвертых, продуктами реакции дезаминирования моноаминов, катализируемой MAO, являются также альдегид и аммиак. Повышение активности MAO ведет к росту продукции этих токсичных соединений, которые вносят свой вклад в усиление выраженности эндотоксикоза [47].

Как указывалось выше, нами было проведено исследование активности MAO у больных с ПЭШ [71]. Регрессионный и факторный анализ показали достоверную связь показателя MAO с тяжестью заболевания по шкале оценки позитивных и негативных синдромов (PANSS). Было установлено, что активность MAO и показатель PANSS связаны положительной корреляционной связью, т.е. с усилением тяжести заболевания можно ожидать увеличения активности MAO. Эти данные позволяют с достаточной степенью уверенности расценивать MAO как специфический компонент патогенетических механизмов первого эпизода шизофрении.

Если до начала лечения величина PANSS была в среднем равна 81,4 балла, то после проведенной антипсихотической терапии с использованием рисперидона (3–6 мг/день в течение 45 дней) эта величина снижалась до 58 баллов. При этом активность MAO тромбоцитов достоверно снижалась ( $p = 0,04$ ) по сравнению со значениями до начала лечения. Тем не менее эти величины оставались достоверно выше тех, что были в контрольной группе, т.е. нормализация активности MAO и метаболизма в целом не происходила [79]. На это, кстати, указывают результаты исследования Ивановой и др. [80], где было установлено, что у больных хронической шизофренией на фоне выраженного клинического улучшения после антипсихотической терапии метаболические процессы, в частности обмен одного из важнейших ферментов, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, оставались глубоко нарушенными.

Статистический анализ показал положительную корреляционную связь между активностью MAO тромбоцитов и показателем PANSS как до, так и после антипсихотической терапии [79].

Полученные нами результаты позволяют высказать предположение, что активность тромбоцитарной MAO может служить потенциальным биомаркером эффективности проводимой фармакотерапии у больных с ПЭШ. По результатам анализа данных литературы и наших исследований, можно сделать следующие выводы:

1. Обращает на себя внимание тот факт, что изменения активности MAO при первом эпизоде шизофрении и тревожной депрессии очень схожи. И хотя в настоящее время неизвестно, с чем это связано, можно предположить, что важную роль здесь играют генетические факторы, вероятнее всего, сложные взаимодействия множества генов. В результате в организме схожие метаболические нарушения вызывают различные симптомокомплексы. Уяснить эти процессы, вероятно, возможно с точки зрения системного подхода [2]. Нейромедиаторные и моноаминергические изменения при шизофрении преимущественно связаны с дофамином, а при депрессии — с серотонином. Можно полагать, что дезаминирующее действие MAO при шизофрении направлено в основном на дофамин, а при депрессии — на серотонин и отчасти на норадреналин.

2. Несмотря на значительное клиническое улучшение при фармакотерапии, у больных с первым эпизодом шизофрении сохраняется значительное нарушение метаболических процессов.

3. Полученные результаты позволяют полагать, что моноаминоксидаза тромбоцитов может служить потенциальным биомаркером эффективности фармакотерапии эндогенных психических расстройств.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на основании наших исследований возможно сделать вывод, что моноаминоксидаза тромбоцитов может служить потенциальным биомаркером эффективности фармакотерапии психических заболеваний — первого эпизода шизофрении и тревожной депрессии.

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

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Scarr, E., Millan, M., Bahn, S., Bertolino, L., Turck, C., et al. (2015) Biomarkers for psychiatry: the journey from fantasy to fact, a report of the 2013 CINP think tank, *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **18**, 1-9, doi: 10.1093/ijnp/pyv042.
- Узбеков М. Г., Гурович И. Я., Иванова С. А. (2016) Потенциальные биомаркеры психических заболеваний в аспекте системного подхода, *Социальная и клиническая психиатрия*, **26**, 98-109.
- Lopresti, A. L., Maker, G. L., Hood, S. D., and Drummond, P. D. (2014) A review of peripheral biomarkers in major depression: the potential of inflammatory and oxidative stress biomarkers, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*, **48**, 102-111, doi: 10.1016/j.pnpbp.2013.09.017.
- Kim, H., Blumberger D., Downar J., and Daskalakis, Z. (2020) Systematic review of biological markers of therapeutic repetitive transcranial magnetic stimulation in neurological and psychiatric disorders, *Clin Neurophysiol.*, **132**, 429-448, doi: 10.1016/j.clinph.2020.11.025.
- Zafar, T. (2020) Potential biomarkers of emotional stress induced neurodegeneration, *eNeurologica Sci.*, **21**, 100292-100297, doi: 10.1016/j.ensci.2020.100292.
- Uzbekov, M. G. (2009) Antidepressant action of tianeptine is connected with acceleration of serotonin turnover in the synapse: a hypothesis, *Neuropsychopharmacol. Hung.*, **10**, 85-89.
- Alawieh, A., Zaraket, F., Li, J., Mondello, S., Nokkari, A., and Razafsha, M. (2012). Systems biology, bioinformatics and biomarkers in neuropsychiatry, *Front. Neurosci.*, **6**, 187-193, doi: 10.3389/fnins.2012.00187.
- Cacabelos, R., Hashimoto, R., and Takeda, M. (2011) Pharmacogenomics of antipsychotics efficacy for schizophrenia, *Psychiatry Clin. Neurosci.*, **65**, 3-19, doi: 10.1111/j.1440-1819.2010.02168.x.
- Linden, D. E. (2012) The challenges and promise of neuroimaging in psychiatry, *Neuron*, **73**, 8-22, doi: 10.1016/j.neuron.2011.12.014.
- Stober, G., Ben-Shachar, D., Cardon, M., Falkai, P., Fonteh, A. N., et al. (2009) Schizophrenia: From the brain to peripheral markers — a consensus paper of the WFSBP Task Force on biological markers, *World J. Biol. Psychiatry*, **10**, 127-155, doi: 10.1080/15622970902898980.
- Nobis, A., Zalewski, D., and Waszkiewicz, N. (2020) Peripheral markers of depression. Review, *J. Clin. Med.*, **9**, 3793-3847, doi: 10.3390/jcm9123793.
- Shih, J. C., Chen, K., and Ridd, M. J. (1999) Monoamine oxidase: from genes to behavior, *Annu. Rev. Neurosci.*, **22**, 197-217, doi: 10.1146/annurev.neuro.22.1.197.
- Bach, A. W. J., Lan, N. C., Johnson, D. L., Abell, C. W., Bemkenek, M. E., et al. (1988) cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 4934-4938.
- Lan, N. C., Heinzmann, C., Gal, A., Klisak, I., Orth, U., et al. (1989) Human monoamine oxidase A and B genes map to Xp 11.23 and are deleted in a patient with Norrie disease, *Genomics*, **4**, 552-559.

15. Горкин В. З. (1981) *Аминоксидазы и их значение в медицине*, Медицина, М.
16. Medvedev, A. E., and Gorkin, V. Z. (1992) Biogenic amines and monoamine oxidases in the regulation of activities of membrane-bound mitochondrial enzymes, *Biogenic Amines*, **8**, 323-338.
17. Горкин В. З., Медведев А. Е. (1994) Моноаминоксидаза, *Белки и пептиды*, т. 1 (ред. В. Т. Иванов и В. М. Липкин) Наука, Москва.
18. Shih, J. C. (2018) Monoamine Oxidase isoenzymes: genes, functions and targets for behavior and cancer therapy, *J. Neural Transm. (Vienna)*, **125**, 1553-1566, doi: 10.1007/s00702-018-1927-8.
19. Tong, J., Meyer, J., Furukawa, Y., Boileau, I., Chang, L.-J., et al. (2013) Distribution of monoamine oxidase proteins in human brain: implications for brain imaging studies, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **33**, 863-871, doi: 10.1038/jcbfm.2013.19.
20. Bergstrom, M., Westerberg, G., and Langstrom, B. (1997) 11C-harmine as a tracer for monoamine oxidase A (MAO-A): *in vitro* and *in vivo* studies, *Nucl. Med. Biol.*, **24**, 287-293.
21. Meyer, J. H., Ginovart, N., Boovariwala, A., Segrati, S., Hussey, D., et al. (2006) Elevated monoamine oxidase A levels in the brain: an explanation for the monoamine imbalance of major depression, *Arch. Gen. Psychiatry*, **63**, 1209-1216, doi: 10.1001/archpsyc.63.11.1209.
22. Sacher, J., Rekkas, P., Wilson, A., Houle, S., Romano, S., et al. (2015) Relationship of monoamine oxidase-A distribution volume to postpartum depression and postpartum crying, *Neuropsychopharmacology*, **40**, 429-435, doi: 10.1038/npp.2014.190.
23. Бриллиантова В. В., Смолина Н. В., Сырейщикова Т. И., Узбеков М. Г., Добрецов Г. Е. (2018) Состояние тиоловых групп альбумина у больных с первым эпизодом шизофрении, *Нейрохимия*, **35**, 96-100, doi: 10.7868/S102781331801003X.
24. Stahl, S. M. (1985) Peripheral models for the study of neurotransmitter receptors in man, *Psychopharmacol. Bull.*, **21**, 663-671.
25. Asor, E., and Ben-Shachar, D. (2012) Platelets: a possible glance into brain biological processes in schizophrenia, *World J. Psychiatry*, **22**, 124-133, doi: 10.5498/wjp.v2.i6.124.
26. Paasonen, M. K., Solatunturi, E., and Kivalo, E. (1964) Monoamine oxidase activity of blood platelets and their ability to store 5-hydroxytryptamine in some mental deficiencies, *Psychopharmacologia*, **6**, 120-124.
27. George, J. (2000) Platelets, *Lancet*, **355**, 1531-1539.
28. Bush, A. I., Martins, R. N., Rumble, B., Moir, R., Fuller, S., et al. (1990) The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease is released by human platelets, *J. Biol. Chem.*, **265**, 15977-15983.
29. Veitinger, M., Varga, B., Guterres, S. B., and Zellner, M. (2014) Platelets, a reliable source for peripheral Alzheimer's disease biomarkers? *Acta Neuropathol. Commun.*, **2**, 65-80, doi: 10.1186/2051-5960-2-65.
30. Pearse, A. G. (1977) The diffuse neuroendocrine system and the apud concept: related "endocrine" peptides in brain, intestine, pituitary, placenta, and anuran cutaneous glands, *Med. Biol.*, **55**, 115-125.
31. Youdim, M. B. (1988) Platelet monoamine oxidase B: use and misuse, *Experientia*, **44**, 137-141.
32. Chen, K., Wu, H. F., and Shih, J. C. (1993) The deduced amino acid sequences of human platelet and frontal cortex monoamine oxidase B are identical, *J. Neurochem.*, **61**, 187-190.
33. Goodwin, F. K., and Jamison, K. R. (2007) *Manic Depressive Illness: Bipolar Disorders and Recurrent Depression*, 2nd Edn., Oxford University Press, N.Y.
34. Kessler, R. C., and Üstün, T. B. (2008) *The WHO World Mental Health Surveys: Global Perspectives on the Epidemiology of Mental Disorders*, Cambridge University Press, N.Y.
35. Kupfer, D. (1999) Depression: a major contributor to world-wide disease burden, *Int. Med. News*, **99**, 1-2.
36. World Health Assembly (2012) Global Burden of Mental Disorders and the Need for a Comprehensive, Coordinated Response from Health and Social Sectors at the Country Level, *Report by The Secretariat World Health Organization*, Geneva, Switzerland.
37. Spinney, L. (2009) European brain policy forum: depression and the european society, *Eur. Psychiatry*, **24**, 550-551, doi: 10.1016/j.eurpsy.2009.04.001.
38. Краснов, В. Н. (2012) Проблемы современной диагностики депрессий, *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, Выпуск 2. Депрессия, **112**, 3-11.
39. Узбеков М. Г., Мисионжник Э. Ю., Шмуклер А. Б., Гурович И. Я., Грызунов Ю. А., и др. (2009) Нарушение активности моноаминоксидазы и показателей эндогенной интоксикации у больных с первым эпизодом шизофрении, *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, **109**, 48-52.
40. Uzbekov, M. G., Misionzhnik, E. Y., Maximova, N. M., and Vertogradova, O. P. (2006) Biochemical profile in patients with anxious depression under the treatment with serotonergic antidepressants with different mechanisms of action, *Hum. Psychopharmacol. Clin. Exp.*, **21**, 109-115, doi: 10.1002/hup.749.
41. Hamilton, M. (1988) In *Handbook of Anxiety Disorders* (Last, C., and Hersen, M., eds.) Pergamon Press, Oxford, pp. 143-155.
42. Zeb, F., Naqvi, S., Rahman, R., and Farooq, A. D. (2017) Depressive symptoms, monoamines levels, MAO-B activity and effect of treatment in a subset of depressed individuals from government sector hospital at Karachi, *Pak. J. Pharm. Sci.*, **30**, 1509-1519.
43. Rusjan, P., Wilson, A., Miler, L., Fan, I., Mizrahi, R., et al. (2014) Kinetic modeling of the monoamine oxidase B radioligand [<sup>11</sup>C]SL25.1188 in human brain with high-resolution positron emission tomography, *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **34**, 883-889, doi: 10.1038/jcbfm.2014.34.
44. Moriguchi, S., Wilson, A., Miler, L., Rusjan, P., Vasdev, N., et al. (2019) Monoamine oxidase B total distribution volume in the prefrontal cortex of major depressive disorder. An [<sup>11</sup>C]SL25.1188 positron emission tomography study, *JAMA Psychiatry*, **76**, 634-641, doi: 10.1001/jamapsychiatry.2019.0044.
45. Higuchi, Y., Soga, T., and Parhar, I. (2017) Regulatory pathways of monoamine oxidase A during social stress, *Front. Neurosci.*, **11**, 604-615, doi: 10.3389/fnins.2017.00604.
46. Johnson, S., Stockmeier, C. A., Meyer, J. H., Austin, M. C., Albert, P. R., and Wang, J. (2011) The reduction of R1, a novel repressor protein for monoamine oxidase A, in major depressive disorder, *Neuropsychopharmacology*, **36**, 2139-2148, doi: 10.1038/npp.2011.105.
47. Узбеков М. Г. (2019) Эндогенная интоксикация и ее роль в патогенетических механизмах психических расстройств, *Социальная и Клиническая Психиатрия*, **29**, 14-20.
48. Mallajosyula, J. K., Chinta, S. J., Rajagopalan, S., Nicholls, D. G., and Andersen, J. K. (2009) Metabolic control analysis in a cellular model of elevated MAO-B: relevance to Parkinson's disease, *Neurotox. Res.*, **16**, 186-193, doi: 10.1007/s12640-009-9032-2.
49. Andreatza, A. C., Shao, L., Wang, J. F., and Young, L. T. (2010) Mitochondrial complex I activity and oxidative damage to mitochondrial proteins in the prefrontal cortex of patients with bipolar disorder, *Arch. Gen. Psychiatry*, **67**, 360-368, doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2010.22.
50. Kasper, S. (2001) Depression and anxiety – separate or continuum, *World J. Biol. Psychiatry*, **2**, 162-163, doi: 10.3109/15622970109026804.
51. Громова Е. А. (1979) В кн. *Катехоламинергические нейроны* (под ред. Турпаева Т. М., и Буданцев А. Ю.) Наука, Москва, с. 97-105.
52. Petty, F., Davis, L. L., Kabel, D., and Kramer, G. L. (1996) Serotonin dysfunction disorders: a behavioral neurochemistry perspective, *J. Clin. Psychiatry*, **5** (Suppl 8), 11-16.
53. Paul, S. M. (1988) Anxiety and depression: a common neurobiological substrate? *J. Clin. Psychiatry*, **49**, 13-16.
54. Hoffman, K. L. (2013) Role of murine models in psychiatric illness drug discovery: a dimensional view, *Expert Opin. Drug Discov.*, **8**, 865-877, doi: 10.1517/17460441.2013.797959.
55. Uzbekov, M. G., and Maximova, N. M. (2016) Monoamine-hormone interactions in the pathogenesis of anxious depression, *Neurosci. Behav. Physiol.*, **46**, 673-676, doi: 10.1007/s11055-016-0295-9.

56. Узбеков М. Г., Максимова Н. М. (2018) Некоторые нейробиологические аспекты патогенеза тревожной депрессии и антиглюкокортикоидная фармакотерапия, *Российский психиатрический журнал*, **2**, 31-39.
57. Лапин И. П. (2004) Стресс – Тревога – Депрессия – Алкоголизм – Эпилепсия (Нейрокинурениновые механизмы и новые подходы к лечению), ДЕАН, СПб.
58. Curzon, P. (1969) Tryptophan pyrrolase – a biochemical factor in depressive illness, *Br. J. Psychiatry*, **115**, 1367-1374.
59. Nemeth, S. (1978) The effect of stress or glucose feeding on hepatic tyrosine aminotransferase activity and liver and plasma tyrosine levels of intact and adrenalectomized rats, *Horm. Metab. Res.*, **10**, 144-147.
60. Chen, K., Ou, X. M., Wu, J. B., and Shih, J. C. (2011) Transcription factor E2F-associated phosphoprotein (EAPP), RAM2/CDCA7L/JPO2 (R1), and simian virus 40 promoter factor 1 (Sp1) cooperatively regulate glucocorticoid activation of monoamine oxidase B, *Mol. Pharmacol.*, **79**, 308-317, doi: 10.1124/mol.110.067439.
61. Ou, X. M., Chen, K., and Shih, J. C. (2004) Dual functions of transcription factors, transforming growth factor- $\beta$ -inducible early gene (TIEG)2 and Sp3, are mediated by CACCC element and Sp1 sites of human monoamine oxidase (MAO) B gene, *J. Biol. Chem.*, **279**, 21021-21028, doi: 10.1074/jbc.M312638200.
62. Uzbekov, M., Syrejschikova, T., Smolina, N., Maximova, N., Shikhov, S., and Brilliantova, V. (2019) Antidepressant Therapy has restored albumin conformation in anxious depression, *Biomed. J. Sci. Tech. Res.*, **24**, 16103-16105, doi: 10.26717/BJSTR.2019.21.003647.
63. Uzbekov, M. G., Syrejschikova, T. I., Smolina, N. V., Brilliantova, V. V., Dobretsov, G. E., and Shikhov, S. N. (2018) Serum albumin conformation in patients with melancholic depression under antidepressant therapy, *Biomed. J. Sci. Tech. Res.*, **7**, 1-2. doi: 10.26717/BJSTR.2018.07.001540.
64. Lenze, E., Hershey, T., Newcomer, J., Karp, J., Blumberger, D., et al. (2014) Antigluco corticoid therapy for older adults with anxiety and cooccurring cognitive dysfunction: results from a pilot study with mifepristone, *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, **29**, 962-969, doi: 10.1002/gps.4085.
65. Гурович И. Я., Ньюфельдт О. Г. (2007) *Современные тенденции развития и новые формы психиатрической помощи*, МЕДПРАКТИКА-М, Москва.
66. Узбеков М. Г. (2017) *Биологические маркеры шизофрении: поиск и клиническое применение* (под ред. Бохана Н. А. и Ивановой С. А.) Издательство СО РАН, Новосибирск, с. 67-89.
67. *Первый психотический эпизод (проблемы и психиатрическая помощь)* (2010) (под ред. Гуровича И. Я. и Шмуклера А. Б) МЕДПРАКТИКА-М, Москва.
68. Albert, N., and Weibell, M. (2019) The outcome of early intervention in first episode psychosis, *Int. Rev. Psychiatry*, **31**, 413-424, doi: 10.1080/09540261.2019.1643703.
69. Spivak, B., Kosower, N., Zipzer, Y., Shreiber-Schul, N., Apter, A., et al. (1994) Platelet monoamine oxidase activity in neuroleptic-naïve schizophrenic patients: lack of influence of chronic perphenazine treatment, *Clin. Neuropharmacol.*, **17**, 83-88.
70. Ertugrul, A., Ucar, G., Basar, K., Demir, B., Yabanoglu, S., and Ulug, B. (2007) Influence of clozapine on platelet serotonin, monoamine oxidase and plasma serotonin level, *Psychiatry Res.*, **149**, 49-57, doi: 10.1016/j.psychres.2005.12.009.
71. Uzbekov, M. G., Misionzhnik, E. Yu., Gurovich, I. Y., and Shmukler, A. B. (2013) Aspects of metabolic changes in first-episode drug-naïve schizophrenic patients, *Acta Neuropsychiatrica*, **25**, 268-274, doi: 10.1017/neu.2013.1.
72. Laruelle, M., and Abi-Dargham, A. (1999) Dopamine as the wind of the psychotic fire: new evidence from brain imaging studies, *Psychopharmacology*, **13**, 358-371.
73. Mateos, J. J., Lomena, F., Parellada, E., Font, M., Fernandez, E., et al. (2006) Striatal dopamine transporter density decrease in the first episode schizophrenic patients treated with risperidone, *Rev. Esp. Med. Nucl.*, **25**, 159-165, doi: 10.1157/13088411.
74. Yoshimura, R., Ueda, N., Shinkai, K., and Nakamura, J. (2003) Plasma levels of homovanillic acid and the response to risperidone in the first episode untreated acute schizophrenia, *Int. Clin. Psychopharmacol.*, **18**, 107-111, doi: 10.1097/00004850-200303000-00008.
75. Marcinko, D., Pivac, N., Martinac, M., Jakovljevic, M., Mihajjevic-Peles, A., and Muck-Seler, D. (2007) Platelet serotonin and serum cholesterol concentrations in suicidal and non-suicidal male patients with a first episode of psychosis, *Psychiatry Res.*, **150**, 105-108.
76. Tan, H. Y., Callicott, J. H., and Weinberger, D. R. (2007) Dysfunctional and compensatory prefrontal cortical systems, genes and the pathogenesis of schizophrenia, *Cereb. Cortex*, **17** (Suppl 1), 171-181, doi: 10.1093/cercor/bhm069.
77. Beckman, K. B., and Ames, B. N. (1998) The free radical theory of aging matures, *Physiol. Rev.*, **78**, 547-581, doi: 10.1152/physrev.1998.78.2.547.
78. Узбеков М. Г. (2014) Перекисное окисление липидов и антиоксидантные системы при психических заболеваниях. Сообщение I, *Социальная и клиническая психиатрия*, **24**, 97-103.
79. Uzbekov, M., Brilliantova, V., Shikhov, S., Smolina, N., Syrejschikova, T., et al. (2019) First episode of schizophrenia: potential biomarkers of pharmacotherapy efficacy, *Eur. Neuropsychopharmacol.*, **29**, S96-S97, doi: 10.1016/j.euroneuro.2018.11.1081.
80. Иванова, С. А., Смирнова Л. П., Шигорева Ю. Г., Бойко А. С., Семке А. В., и др. (2014) Активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и каталазы в эритроцитах больных шизофренией в динамике фармакотерапии традиционными антипсихотическими препаратами, *Нейрохимия*, **31**, 79-83, doi: 10.1134/S1819712414010061.

## MONOAMINE OXIDASE AS A POTENTIAL BIOLOGICAL MARKER FOR THE THERAPY EFFICACY OF MENTAL DISORDERS

### Review

M. G. Uzbekov

Moscow Research Institute of Psychiatry – Branch of V. P. Serbsky NMRCMH, 107076 Moscow, Russia; e-mail: [uzbekovmg@gmail.com](mailto:uzbekovmg@gmail.com)

The review summarizes results of our own investigations and literature data on the search for biological markers of psychiatric disorders. The platelet monoamine oxidase activity is considered as a potential biomarker for these diseases. Studies that included pharmacotherapy in patients with mixed anxiety-depressive disorder and first episode of schizophrenia have shown that the platelet monoamine oxidase activity could serve as a potential biomarker of the efficacy of therapeutic interventions.

**Keywords:** platelet monoamine oxidase, biomarker, systems approach, anxious depression, first episode of schizophrenia, pharmacotherapy