НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ:

от генома до целостного организма

Под редакцией
академика РАН М.В. УГРЮМОВА

ТОМ 2

МОСКВА НАУЧНЫЙ МИР 2014

УДК 616.8
ББК 56.1
Н38

НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ: от генома до целостного организма. В 2-х томах. Том 2 / Под ред. М.В. Угрюмова. – М.: Научный мир, 2014. – 848 с.

ISBN 978-5-91522-400-0 (общ.)
ISBN 978-5-91522-401-7 (том 2)

Монография посвящена современным представлениям об эпидемиологии, фармакоэкономике, клинике, патогенезе, диагностике и лечении социально значимых нейродегенеративных заболеваний, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и др. Наряду с описанием мировых достижений, обобщены результаты многолетних мультидисциплинарных исследований, выполненных авторами – ведущими российскими неврологами, психиатрами, нейрофизиологами, фармакологами, молекулярными биологами, генетиками, математиками, физиками и химиками по программе Российской академии наук «Фундаментальные науки – медицине». Основное внимание сосредоточено на создании и использовании новых «прорывных» технологий доклинической диагностики – задолго до появления симптомов, и превентивного лечения, направленного на остановку гибели специфических нейронов. При этом дается оценка нейротехнологий, позволяющих понять молекулярные механизмы функционирования мозга в норме и при патологии, создать диагностику на основе геномики, эпигеномики и протеомики, найти новые молекулярные мишени для лекарственных веществ и способы их адресной доставки.

Для широкого круга биологов и медиков, а также для преподавателей и студентов биологических и медицинских вузов.

Дополнительный тираж публикуется при финансовой поддержке Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине».

NEURODEGENERATIVE DISEASES: from genome to the whole organism. Vol. 2 / Ed. M.V. Ugrumov. – M.: Scientific World, 2014. – 848 p.

The monograph is devoted to the advanced concepts of epidemiology, pharmacoeconomics, clinics, pathogenesis, diagnostics and treatment of socially significant neurodegenerative diseases, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and others. Along with the description of the world progress, the monograph summarizes the results of long-term multidisciplinary research carried out by the authors, leading Russian neurologists, psychiatrists, neurophysiologists, pharmacologists, molecular biologists, genetics, mathematicians, physicists and chemists in the frame of the program of the Russian Academy of Sciences «Basic Science for Medicine». The main attention was attracted to the development and use of advanced «breakthrough» technologies for preclinical diagnostics, long before the appearance of symptoms, and creation of preventive therapy, serving to stop the death of specific neurons. Furthermore, it was given a description of recent neurotechnologies, which serve to discover unknown molecular mechanisms of brain functions in health and disease, make diagnostics, based on genomics, proteomics, and genomics, find new molecular targets for drugs, and methods of targeted delivery.

For a wide range of biologists and physicians, as well as for teachers and students of biological and medical faculties of the universities.

ISBN 978-5-91522-400-0 (общ.)
ISBN 978-5-91522-401-7 (том 2)

© Коллектив авторов, 2014
© Научный мир, 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

Часть III
КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ И ИХ РЕГУЛЯЦИЯ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Глава 1. **Когнитивные функции в норме и при некоторых психических заболеваниях**

Организация высших форм памяти у человека и структуры гиппокампа
(*А.М. Иваницкий*) 7

Анатомо-функциональная организация и механизмы работы мозга
человека при длительных нарушениях сознания как инновационная
основа для разработки лечения этой патологии
(*Ю.И. Вайншенкер, И.М. Ивченко, А.Д. Коротков, С.В. Медведев*) 15

Анализ ассоциации полиморфных вариантов генов-кандидатов
с параноидной шизофренией и ответом на типичные нейролептики
(*А.Э. Гареева, Э.К. Хуснутдинова*) 28

Экстралингвистические характеристики речевого сигнала
и показатели ЭЭГ у больных с различными аффективными расстройствами
(*Н.Н. Лебедева, Е.Д. Каримова, Е.А. Казимирова*) 50

Особенности μ-ритма ЭЭГ при шизофрении и аутизме
(*В.Б. Стрелец, Ж.В. Гарах, В.Ю. Новотоцкий-Власов,*
О.Ю. Хаердинова, Е.А. Лущекина, В.С. Лущекин) 68

Глава 2. Нарушения когнитивных функций и их регуляции при болезни Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера – клиника, диагностика и лечение
(*С.И. Гаврилова*) 82

Ранняя диагностика болезни Альцгеймера на додементной стадии
и превентивная терапия
(*С.И. Гаврилова, Н.Д. Селезнева, И.Ф. Рощина, Я.Б. Федорова*) 95

Стратегии поиска биомаркеров синдрома мягкого когнитивного
снижения и болезни Альцгеймера
(*И.А. Журавин, С.И. Гаврилова, Я.Б. Федорова, Н.М. Дубровская,*
Д.И. Козлова, С.А. Плеснева, Н.Н. Наливаева)..... 124

Молекулярные аспекты патогенеза и современные подходы
к фармакологической коррекции болезни Альцгеймера
(*М.С. Кухарский, Р.К. Овчинников, А.А. Устюгов, С.О. Бачурин*) 137

Патогенез болезни Альцгеймера и кальциевый гомостаз
(*М.А. Рязанцева, Г.Н. Можаева, Е.В. Казначеева*) 163

Формирование пусковых факторов амилоидоза нейронов и активация теплозащитных механизмов латентной стадии болезни Альцгеймера
(*А.В. Мальцев, О.В. Галзитская*) 182

Роль предшественника амилоидного пептида и его метаболитов в патогенезе болезни Альцгеймера
(*Н.Н. Наливаева, И.А. Журавин, Э. Дж. Тернер*) 224

Изучение амилоидогенеза *in vitro*: значение для разработки диагностики и терапии амилоидозов
(*З.А. Подлубная, А.Г. Бобылёв*) 274

Потенциальная роль сфинголипидов в качестве биомаркеров болезни Альцгеймера
(*А.В. Алесенко, С.И. Гаврилова*) 298

Дисфункция синапсов при нейродегенеративных заболеваниях и старении
(*А.Л. Шварцман, С.В. Саранцева*) 321

Дисфункция периферических возбудимых структур при нейродегенеративных заболеваниях
(*М.А. Мухамедьяров, П.Н. Григорьев, А.В. Леушина, А.А. Ризванов, А.В. Мартынов, Р.Р. Исламов, А.Л. Зефиров*) 339

Инъекционные модели болезни Альцгеймера как подход к исследованию клеточных механизмов патогенеза:
нейродегенеративных изменений, воспаления, нарушений нейрогенеза
(*М.Ю. Степаничев, Н.В. Гуляева*) 352

Изучение динамики нейродегенерации и компенсаторных механизмов у бульбэктомированных животных
(*Н.В. Бобкова, М.Б. Евгеньев*) 380

Нарушение активности мозга на модели болезни Альцгеймера
(*Е.А. Муганцева*) 405

Изучение механизмов когнитивных дисфункций с использованием модели пренатальной гипоксии
(*И.А. Журавин, Д.С. Васильев, Н.М. Дубровская, Д.И. Козлова, Е.Г. Кочкина, С.А. Плеснева, Н.Л. Туманова, О.С. Алексеева, А.Н. Ветош, Н.Н. Наливаева*) 419

Моделирование патогенеза нейродегенеративных заболеваний на *Drosophila melanogaster*
(*С.В. Саранцева, А.Л. Шварцман*) 438

Молекулярно-генетическая модель таупатии на основе сверхэкспрессии протеинкиназы GSK3β в нервной системе *Drosophila melanogaster*
(*М.В. Тростников, Н.В. Рощина, А.В. Симоненко, Д.В. Муха, Е.Г. Пасюкова*) 453

Глава 3. **Нарушение сенсорики**

Молекулярные механизмы нейродегенерации клеток сетчатки при ишемии
(*Г.Р. Каламкаров, А.Е. Бугрова, Т.С. Константинова, Т.Ф. Шевченко*) 465

Флуорофоры липофусциновых гранул в клетках ретинального пигментного эпителия и аутофлуоресценция глазного дна человека как новый неинвазивный метод диагностики старческих изменений и дегенеративных заболеваний сетчатки (*М.А. Островский, Т.Б. Фельдман, М.А. Яковлева, С.А. Борзенок, П.М. Арбуханова*) 489

Повреждение и восстановление сетчатки у мышей после воздействия генотоксических агентов ионизирующей радиации и метилнитрозомочевины (*В.А. Тронов, Ю.В. Виноградова, В.А. Поплинская, М.А. Островский*) 523

Часть IV
НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ, ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЗГА

Глава 1. Методы исследований

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы: физиологические функции и роль в нейродегенеративных процессах (*Е.В. Крюкова, И.В. Шелухина, М.Н. Жмак, М.Н. Осипов, Д.С. Кудрявцев, Л.О. Оджомоко, И.Е. Кашеверов, Ю.Н. Уткин, В.И. Цетлин*) 542

Экспериментальные модели гиперпролактинемии (*Т.С. Пронина, Л.К. Дильмухаметова, М.В. Угрюмов*) 555

Автоматизация анализа изображений в исследованиях мозга: постановка задач, математические основы, информационные технологии (*И.Б. Гуревич, Ю.И. Журавлев, А.А. Мягков, А.А. Колачева, Ю.О. Трусова, В.В. Яшина, Т.С. Пронина, М.В. Угрюмов*) 570

Система компьютерной реконструкции 3D-распределений нейронов (*О.В. Евсеев, Е.В. Анциперов, Ю.В. Обухов, А.А. Колачева, М.В. Угрюмов*) 618

Компьютерный метод объективизации головокружения и дифференциации вестибулопатий разного генеза (*Л.Н. Корнилова, Г.А. Екимовский, Е.В. Хабарова, Д.О. Глухих, И.А. Наумов, В.Н. Сагалович, Е.Г. Филатова, В.И. Федорова*) 634

Глава 2. Диагностика

Позитронная эмиссионная томография в исследованиях рецепторов мозга: дофаминергическая система (*Р.Н. Красикова*) 650

Использование магнитно-резонансной спектроскопии для диагностики и мониторинга лечения неврологических и психических заболеваний (*Н.А. Семенова, Т.А. Ахадов, М.В. Ублинский, С.Д. Варфоломеев*) 662

Влияние острого введения алкоголя на личностные свойства и системную организацию поведения в реальной и виртуальной средах (*Б.Н. Безденежных, Ю.И. Александров*) 680

Технология оптической интраоперационной диагностики в нейроонкологии
на основе спектроскопического анализа нервных тканей
(*Т.А. Савельева, В.Б. Лощенов, А.В. Рябова, М.В. Лощенов, П.В. Грачев, М.А. Исаев, Д.В. Поминова, В.В. Волков, С.А. Горяйнов, П.В. Зеленков, Г.М. Юсубалиева, Г.В. Павлова, А.А. Потапов*) 705

Глава 3. **Лечение**

Нейролипины – эндогенные нейропротекторы при ишемии мозга и основа для создания
новых гибридных мультифункциональных препаратов
(*М.Ю. Бобров, Н.М. Грецкая, М.Г. Акимов, В.В. Безуглов*) 726

Исследование фармакокинетики и фармакодинамики амидной формы
нейропротекторного пептида HLDF-6 с использованием равномерно меченных
изотопами водорода соединений
(*Ю.А. Золотарев, Г.И. Ковалев, А.К. Дадаян, В.С. Козик, Е.А. Кондрахин, Е.В. Васильева, В.М. Липкин*) 763

Нейропротектирующее действие иммуномодуляторов на дегенерирующие нейроны
гиппокампа как основа для поиска лекарственных веществ
(*О.В., Годухин, Е.А. Туровский, М.В. Туровская, Е.А. Туховская, С.Г. Левин, Т.А. Савина, Т.Г. Щипакина, М.В. Конаков, В.П. Зинченко, А.Н. Мурашов*) 778

Применение аденозинфосфатов для предотвращения молекулярного старения
NADH-дегидрогеназы в митохондриях
(*М.С. Фролова, Н.Л. Векшин*) 789

Репрограммирование соматических клеток: возможности применения
для изучения болезней нервной системы и разработки методов лечения
(*Е.Д. Некрасов, И.В. Честков, М.А. Лагарькова, С.Л. Киселев*) 799

Разработка пористых полимерных матриксов-носителей для нейротрансплантатов
(*В.Н. Багграташвили, Е.Н. Антонов, А.В. Королева, В.К. Попов, П.С. Тимашев, А.В. Миронов, Б.Н. Чичков, М.В. Ведунова, Т.В. Шишкина, Е.В. Митрошина, Т.А. Сахарнова, И.В. Мухина)* 811

Перспективы применения лентивирусной трансдукции клеток мозга
для доставки генов нейротрофинов в область «полутени» ишемического очага
(*Г.Р. Тухбатова, М.В. Гуляев, М.М. Свинов, П.М. Балабан, С.В. Саложин*) 839

Часть III

КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ И ИХ РЕГУЛЯЦИЯ В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Глава 1

КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ В НОРМЕ И ПРИ НЕКОТОРЫХ ПСИХИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Организация высших форм памяти у человека и структуры гиппокампа

А.М. Иваницкий

Содержание

1. Память и медио-базальные отделы височной коры. Семантическая и эпизодическая память человека
2. Электрофизиологическое выражение работы семантической и эпизодической памяти
3. Избирательное вербальное внимание, семантические системы мозга и их связь с памятью
4. Нейрохимическая гетерогенность структур, отвечающих за память и внимание. Возможные клинические следствия

1. Память и медио-базальные отделы височной коры. Семантическая и эпизодическая память человека

Память – важнейшая функция мозга. Достаточно сказать, что все высшие функции мозга невозможны без участия памяти, а его наиболее совершенное проявление в виде сознание человека основано на сопоставлении новой информации с памятью (Иваницкий, 1976, 1997, 2004; Edelman, 1989, 2000). В частности, важным свойством сознания представляется способность сохранять в памяти последовательность происходивших событий и произвольно извлекать их из недр памяти. Французский философ Анри Бергсон называл данное свойство «памятью души», в отличие от «памяти тела», ответственной за двигательные и другие навыки. Современная терминология именует их соответственно как эпизодическая (декларативная) и процедурная (рабочая) память.

Сокращения: ВП – вызванный потенциал.

Последние десятилетия ознаменовались прорывом в исследовании их мозговых механизмов (Виноградова, 1975; Squire, Zola, 1996; Mishkin et al., 1997). Считается, что долговременная память связана преимущественно с ассоциативной корой. По одной из гипотез, в адресации памятных следов в определенные участки коры важную роль играют медио-базальные отделы височной области полушарий, включающие энторинальную и перинатальную кору и гиппокамп (он представляет собой изогнутую полоску нейронов, напоминающую по форме морского конька, откуда и название). Вышеназванные образования имеют обширные связи как между собой, так и с проекционными и ассоциативными отделами коры. При запоминании они направляют сигнал в ассоциативную кору для длительного удержания в памяти, а при необходимости вспомнить – указывают адрес, где хранится связанная с поступившим сигналом информация. Для ясности приведем простой пример. Долговременная память соответствует книгохранилищу в библиотеке, а гиппокампальный комплекс можно сравнить с каталогом, который показывает, где хранится нужная книга. Согласно другим взглядам, и само хранение информации может происходить в медио-базальных отделах полушарий.

Различие между разными отделами гиппокампального комплекса заключается в том, что энторинальная кора участвует в сохранении сведений вне их связи с контекстом (иногда это обозначается как семантическая память), а гиппокамп важен для эпизодической памяти, хранящей сведения в их связи с контекстом. По Р. Томпсону (Thompson, 2005), в первом случае в памяти сохраняются факты, а во втором – события. Используется и такой пример. Предположим, что вы встречаете человека, лицо которого вам знакомо, но вы не можете вспомнить, кто он – это узнавание, или семантическая память. Если же вы помните, кто этот человек, и при каких обстоятельствах вы познакомились, речь идет о вспоминании, об эпизодической, или декларативной, памяти.

2. Электрофизиологическое выражение работы семантической и эпизодической памяти

Оба вида памяти, особенно при запоминании вербальной информации, имеют определенное электрофизиологическое выражение в рисунке вызванных потенциалов (ВП) мозга (Rugg et al., 1998). Они проявляются в виде позитивного сдвига его поздних «когнитивных» волн с латентностью около 400 мс для семантической и 500–700 мс для эпизодической памяти, что было доказано, в частности, с помощью прямого отведения ВП у больных (Halgren, Smith, 1987) от гиппокампальных структур через вживленные электроды. Описаны также различия корковых ВП, связанные с узнаванием и вспоминанием, в виде так называемых париетального и лобного эффекта (Rugg, Curran, 2007). В последнее время установлено, что узнавание может проявляться и в изменении амплитуды более ранних волн с латентностью до 100 мс (Ivanitsky et al., 2009). Кроме того, вспоминание отличается от узнавания значительно большим количеством связей между отделами коры (Burdgess, Ali, 2002).

Повреждение гиппокампа приводит к нарушению эпизодической памяти. Такие больные могут достаточно хорошо усваивать новые сведения, в том числе язык, успешно учиться в школе и иметь достаточно высокий интеллектуальный коэффициент. В то же время, они беспомощны в повседневной жизни, так как не помнят последовательности событий, не ориентируются во времени, не могут составить плана на будущее (Vargha-Khadem et al., 2001). Англоязычные авторы говорят при этом о нарушении двух свойств: принадлежности (belongings) и приурочения события ко времени (appointments). Интересно, что данное заболевание проявляется только с 5–6-летнего возраста, то есть с того момента, когда здоровый человек начинает себя помнить. Известно также, что многие проявления болезни Альцгеймера, особенно на ее ранних этапах, связаны с поражением медио-базальных отделов височной коры.

В сохранении в памяти последовательности событий важную роль, наряду с гиппокампом, играет и лобная кора (Goldman-Rakic, 1996). В ней можно выделить три группы нейронов: одни реагируют на действующий сигнал, другие сохраняют его след до того момента, когда необходимо дать поведенческий ответ, и наконец, третьи включают ответную реакцию. Нейроны разряжаются последовательно и как бы передают эстафету от одной группы к другой. Можно заключить, что эпизодическая память обеспечивается взаимодействием лобной коры и гиппокампа.

Помимо отслеживания временной последовательности событий, структуры гиппокампального комплекса играют важную роль в ориентации в ппространстве. Около 40 лет назад в гиппокампе у крыс были обнаружены так называемые «клеки места (place cell)» (O'Keefe, Dostrovsky, 1971). Они возбуждаются при нахождении животного в определенной точке жизненного пространства. Более поздними исследованиями было описано еще два вида клеток (Wills et al., 2010; Palmer, Lynch, 2010).

Первый из них – «клетки направления (direction cell)» в субикулуме (основании гиппокампа), которые возбуждается, когда голова животного поворачивается в определенную сторону. Второй вид – «клетка сетки (grid cell)» в энторинальной коре – возбуждается при пересечении животным узлов воображаемой координатной сетки. Интересно, что первые два вида клеток – клетки места и клетки направления – имеются уже у новорожденных крысят и, следовательно, их функция не зависит от обучения.

Таким образом, структуры гиппокампальной области ответственны за два важнейших параметра соотношения субъекта с окружающим миром: его привязке ко времени и пространству.

3. Избирательное вербальное внимание, семантические системы мозга и их связь с памятью

Наши исследования показали также, что память играет важную роль в механизмах избирательного внимания к словесным сигналам, когда человек должен реагировать лишь на слова, исходящие из одного источника, выделяя их из мас-

сы других. Такая ситуация возникает, например, когда человек читает книгу при включенном радио. Иногда это явление обозначают как «эффект коктейль-парти». Сложность эффекта заключается в том, что слово всегда имеет определенную значимость, несет смысловую нагрузку. В нашей работе (Иваницкий и др., 2003) использовалась запись ВП мозга на слова, одновременно появлявшиеся на экране монитора и звучавшие через компьютерные колонки. Задача испытуемого состояла в том, чтобы запомнить как можно больше слов, поступавших по одному из каналов, игнорируя другие. Как правило, эта задача успешно выполнялась. Действительно, после опыта испытуемые могли назвать достаточно много слов, поступивших по релевантному каналу, и почти не помнили незначимые слова. В контрольной серии, когда нужно было запоминать все слова, число активно названных слов равномерно распределялось между прочитанными и услышанными словами, а их общее число было приблизительно равно числу слов, запомненных при включении избирательного внимания. Как уже говорилось, запоминание и извлечение из памяти вербальной информации имеет определенное электрофизиологическое выражение в «когнитивных» компонентах ВП с латентностью от 400 до 700 мс. Было установлено, что ВП на значимые слова характеризовался позитивным сдвигом, в то время как в ответ на игнорируемый сигнал имел место негативный сдвиг потенциала, то есть сдвиг, обратный по полярности тому, который возникал при запоминании (рис. 1). ВП в этом временном отрезке был даже более негативен, чем ВП при отсутствии задания запоминать слова, что свидетельствует об активном торможении процессов запоминания. Использование метода локализации дипольных источников этого негативного потенциала показало, что источник этого сдвига локализовался именно в гиппокампе, что говорило о блокаде эпизодической памяти. Источник позитивного сдвига потенциала на релевантные слова локализовался в парагиппокампе, который включает и энторинальную кору, что говорит о работе семантической памяти (Мнацаканян и др., 2005).

Отсюда следует, что избирательность внимания обеспечивается за счет того, что ненужная информация хотя и воспринимается, но затем передача сведений на структуры гиппокампа блокируется. В результате ненужная информация не сохраняется в эпизодической памяти. Такая трактовка подтверждается двумя фактами. Во-первых, это сохранность компонентов ВП, ответственных за восприятие, а именно – его волн с латентностью до 300 мс (Иваницкий и др., 1984). Во-вторых, в дополнительных опытах было показано, что человек может узнать многие слова, поступившие по нерелевантному каналу, если ему показать список слов, которые он должен был игнорировать. Следовательно, он действительно слышал или видел эти слова. Преимущества такой организации вербального внимания в том, что человек может отреагировать на неожиданный сигнал, если этого потребует изменившаяся ситуация (в нашем примере – важное сообщение по радио). В обычных же условиях лишняя информация просто вытесняется из сознания.

Описанный выше вид памяти, при которой человек вспоминал нужную информацию только после подсказки, называется, как уже говорилось, «памятью узнавания». Оказалось, что этот вид памяти используется также в ситуациях быстрого, не контролируемого сознанием восприятия (Ильюченок и др., 2007; Sysoeva et al.,

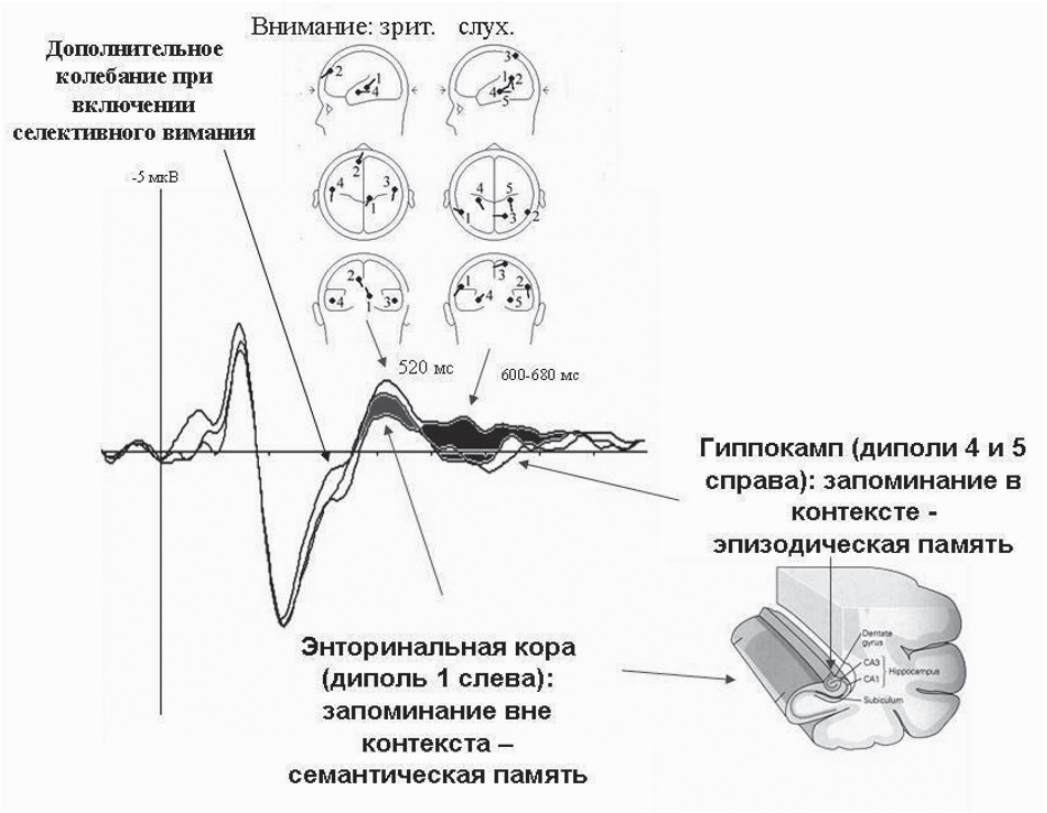


Рис. 1. Вызванные потенциалы мозга в ситуации внимания ко всем стимулам (контроль), а также в ситуациях избирательного внимания, а именно – при инструкции запоминать только слова на экране монитора или звучащие через компьютерные колонки

При внимании к зрительным стимулам отмечается позитивный сдвиг потенциала в диапазоне 400 мс после начала предъявления стимула (серая заливка), при внимании к слуховым стимулам – негативный сдвиг в диапазоне 500–700 мс после стимула (черная заливка). Негативный сдвиг свидетельствует о торможении запоминания нерелевантных слов. Вверху показаны дипольные модели источников волн вызванного потенциала, которые указывают на активность парагиппокампальных структур в первом и гиппокампа во втором случаях. Справа внизу – структуры медио-базального отдела височной коры

2007; Ivanitsky et al., 2009). Общая схема эксперимента, если исключить некоторые детали, была следующей. Испытуемому предъявлялись на экране монитора слова. В одной серии он (или она) должен был просто читать про себя написанное слово, а в другом – классифицировать их на конкретные или абстрактные, нажимая соответствующие кнопки. Оказалось, что при простом чтении слова различия в ВП между абстрактными и конкретными словами отмечались уже в ранних волнах ВП с латентностью до 120 мс, в то время как при инструкции классифицировать слова эти различия, как правило, проявлялись лишь в поздних волнах с латентностью 400–700 мс. После опыта испытуемых просили написать по памяти список показанных слов, а затем найти показанные слова в списке, содержащем как предъ-

явленные, так и не показанные ранее слова. Были использованы и другие более сложные схемы опыта, описанные в процитированных выше статьях. Общий вывод был следующим. Мозг располагает двумя семантическими системами, то есть механизма определения смысла слова. Одна из них – быстрая, автоматическая. Она может использоваться, например, при быстром чтении или разговоре. Другая система – более медленная, контролируемая сознанием. Она включается при тех или иных сложностях в восприятии слов, например, при чтении малознакомого слова. Быстрая система хранит полученную информацию, как правило, в имплицитной памяти узнавания, в качестве подсказки здесь может использоваться контекст. Медленная, эксплицитная, система связана с активной эпизодической памятью, информация из которой может быть извлечена произвольно, путем умственного усилия, как это бывает, когда человек вспоминает, что значит данное слово, или когда он ищет, какое слово лучше передаст его мысль.

4. Нейрохимическая гетерогенность структур, отвечающих за память и внимание. Возможные клинические следствия

Полученные результаты дают основание для поиска дополнительных подходом к пониманию природы некоторых нарушений памяти при болезни Альцгеймера и, возможно, церебральном атеросклерозе. Можно предполагать, что в этом случае, особенно на ранних этапах болезни, ослаблена не только память, но и способность сосредоточивать внимание на нужной информации, с включением механизмов избирательного внимания, обеспечивающего запоминание нужной и блокаду запоминания ненужной информации. Такие нарушения внимания известны клиницистам. Они были также описаны нейропсихологами (Rizzo et al., 2000). Если это так, то для лечения болезни, возможно, следует использовать новый класс лекарственных средств. Дело в том, что отделы мозга, регулирующие внимание, и структуры, ответственные за память, используют различные медиаторы. За переключение внимание с одного канала на другой отвечает так называемая «исполнительная система внимания» (Posner, Raichle, 1997), расположенная в передней части поясной извилины, активация которой была отмечена и в нашей работе. В качестве медиатора в этой системе используется дофамин. Структуры гиппокампального комплекса неоднородны по своей нейрохимической природе, но важную роль там играют ацетилхолин и глютамат. В частности, для лечения болезни Альцгеймера обычно используют препараты, усиливающие обмен ацетилхолина.

В связи со сказанным возник вопрос о возможности использования при лечении этого заболевания нового класса препаратов, усиливающих обмен дофамина. По устному сообщению С.И. Гавриловой (Центр психического здоровья РАМН) – в их клинике было проведено лечение лиц с мягким когнитивным снижением с использованием лекарственного препарата пронорана (Франция), обладающего дофаминергическим действием и обычно используемым при лечении болезни Паркинсона. После окончания лечения был получен отчетливый позитивный эффект.

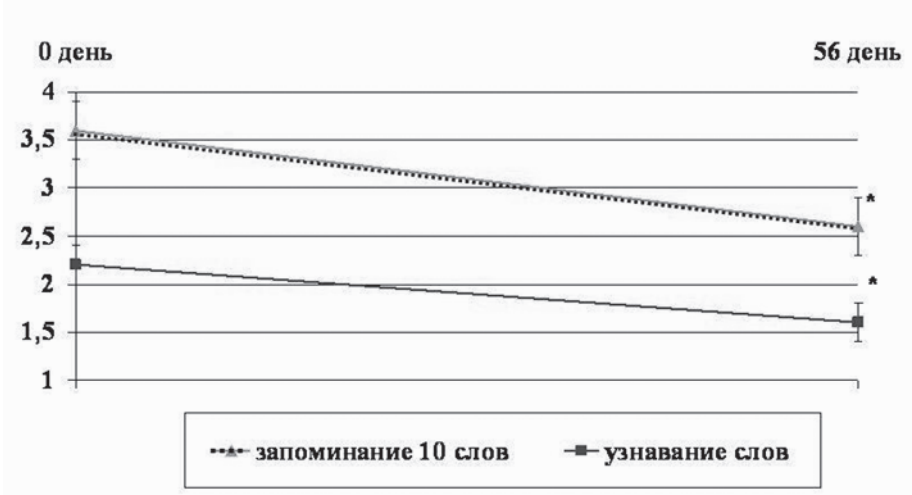


Рис. 2. Динамика нарушений когнитивных функций по двум показателям шкалы ADAS-cog (тест на запоминание слов) у лиц с мягким когнитивным снижением в процессе лечения пронораном – агнистом дофамина

По оси ординат – количество ошибок, которое снижается после лечения. * – статистически значимые различия. Данные С.И. Гавриловой (Научный центр психического здоровья РАМН)

У больных улучшались показатели когнитивной деятельности, что было подтверждено психологическими тестами (рис. 2, любезно предоставленный С.И. Гавриловой). Был использован, в частности, тест на запоминания слов, причем после лечения улучшалось как активное воспроизведение ранее показанных слов, так и их узнавание. Эти результаты, очевидно, могут рассматриваться как подтверждение наших представлений о механизмах избирательного внимания, которые дают теоретическое обоснование клиническим данным по лечению мягких когнитивных расстройств препаратами дофаминергического ряда.

Литература

Виноградова О.С. Гиппокамп и память. М.: Наука, 1975. 333 с.

Иваницкий А.М. Мозговые механизмы оценки сигналов. М.: Медицина, 1976. 264 с.

Иваницкий А.М. Информационный синтез в ключевых отделах коры как основа субъективных переживаний // ЖВНД. 1997. Т. 47. № 2. С. 209-225.

Иваницкий А.М. Естественные науки и проблема сознания // Вестник РАН. 2004. Т. 74. № 8. С. 716-723.

Иваницкий А.М., Стрелец В..Б., Корсаков И.А.. Информационные процессы мозга и психическая деятельность. М.: Наука, 1984. 200 с.

Иваницкий А.М., Ильюченок И.Р., Иваницкий Г.А. Избирательное внимание и память – вызванные потенциалы при конкуренции зрительных и слуховых словесных сигналов // ЖВНД. 2003. Т. 53. Вып. 5. С. 541-551.

Ильюченок И.Р., Сысоева О.В., Иваницкий А.М. Две семантические системы мозга для быстрого и медленного различения абстрактных и конкретных слов // ЖВНД. 2007. Т. 57. Вып. 5. С. 545-554.

Мнацаканян Е.В., Илъюченок И.Р., Иваницкий Г.А., Иваницкий А.М. Дипольные модели источников поздних компонентов вызванных потенциалов в вербальных задачах на интермодальное внимание и память у человека // ЖВНД. 2005. Т. 55. № 3. С. 315-321.

Burgess A.P., Ali L. Functional connectivity of gamma EEG activity is modulated at low frequency during conscious recollection // Int. J. Psychophysiol. 2002. Vol. 46. № 2. P. 91-100.
Edelman G.M. The remembered present: a biological theory of consciousness. NY: Basic Books, 1989. 346 p.
Edelman G.M., Tononi G. Consciousness. How matter becomes imagination. London: Pinguin Books, 2000. 274 p.
Goldman-Rakic P.C. Regional and cellular fractionation of working memory // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 13473-13480.
Halgren E., Smith M.I. Cognitive evoked potentials as modulatory processes in human memory formation and retrieval // Human Neurobiol. 1987. Vol. 6. № 2. P. 129-139.
Ivanitsky A.M., Ivanitsky G.A., Sysoeva O.V. Brain science: on the way to solving the problem of consciousness // Int. J. Psychophysiol., 2009. Vol. 73. № 2. P. 101-108.
Mishkin M., Suzuki W., Gadian D.G., Varha-Khadem F. Hierarhical organization of cognitive memory // Phi. Trans. R. Soc. Lond. B. 1997. Vol. 352. P. 1461-1467.
O'Keefe J., Dostrovsky J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat // Brain Res. 1971. Vol. 34, P. 171-175. PMID 512491.
Palmer L., Lynch G. A Kantian View of Space // Science. 2010. Vol. 328. P. 1487-1488.
Posner M.I., Raichle M.E. Images of Mind. NY: Sci. Amer. Library, 1997. 255 p.
Rizzo M., Anderson S.W., Dawson J. et al. Visual attention impairments in Alzheimer's disease // Neurol. 2000. Vol. 54. № 10. P.1954-1959.
Rosamund F., Ainge J. A., Couey J.J. et al. Development of the spatial representation system in the rat // Science. 2010. Vol. 328. P. 1576-1580.
Rugg M.D., Curran T. Evevt-related potentials and recognition memory // Trands in Cognitive Sciences. 2007. Vol. 11. № 6. P. 251-256.
Rugg M.D., Mark R.E., Walla P. et al. Dissociation of neural correlates of implicit and explicit memory // Nature. 1998. Vol. 392. P. 595-598.
Skrandies W., 1998. Evoked potential correlates of semantic meaning – a brain mapping study // Cogn. Brain Res. Vol. 6. P. 173-183.
Squire L.R., Zola S.M. Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 13515-13522.
Sysoeva O.V., Ilyutchenok I.R., Ivanitsky A.M. Implicit and explicit brain systems of abstract and concrete words differentiation // Int. J. Psychophys. 2007. Vol. 65. P. 272-283.
Thompson R.F. In search of memory traces // Annu. Rev. Psychol. 2005. Vol. 56. P. 1-23.
Vargha-Khadem F., Gadian D. G., Mishkin M. Dissociation in cognitive memory: the syndrome of developmental amnesia // Phil. Trans. R.. Soc. Lond. B. 2001. Vol. 356. № 1413. P. 1435-1440.
Wills T.J., Cacucci F., Burgess N., O'Keefe J. Development of the hippocampal cognitive map in preweanling rats // Science. 2010. Vol. 328. P. 1573-1576.

Анатомо-функциональная организация и механизмы работы мозга человека при длительных нарушениях сознания как инновационная основа для разработки лечения этой патологии

Ю.И. Вайншенкер, И.М. Ивченко, А.Д. Коротков, С.В. Медведев

Содержание

1. Введение
2. Длительные нарушения сознания как проявление устойчивого патологического состояния
3. Маломанифестные инфекции как факторы закрепления устойчивого патологического состояния головного мозга у больных в вегетативном состоянии
4. Полифункциональность нейронов: блокирование патологической экстремальной афферентации приводит к улучшению высших функций мозга (на примере больных в вегетативном состоянии)
5. Заключение

1. Введение

Длительные нарушения сознания – вегетативное состояние, когда на фоне бодрствования у пациентов нет осознания себя и окружающего, или малое сознание, когда пациент начинает фиксировать взор, эмоционально реагировать на родственников и выполнять простые команды – рассматриваются как этапы выхода из комы. Эффективность восстановления сознания при его длительных нарушениях остается низкой. Известны попытки воздействовать на патофизиологические процессы, развивающиеся при вегетативном состоянии, с позиций порочного круга, концепции патологической системы Г.Н. Крыжановского (Крыжановский, 1997; Кондратьева, 2004; Климаш, 2005), но результаты, которые при этом наблюдают, нередко выходят за рамки этих теорий. Это значительно затрудняет разработку как патогенетически обоснованного лечения, так и достоверных прогностических критериев восстановления сознания. Настоящая работа представляет собой обобщение результатов серии исследований, посвященных изучению особенностей анатомо-функциональной организации мозга при длительных нарушениях сознания.

Сокращения: БЭА – биоэлектрическая активность; ВС – вегетативное состояние; ММИ – маломанифестные инфекции; МРТ – магнитно-резонансная томография; ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография; СМГ – скорость метаболизма глюкозы; УПС – устойчивое патологическое состояние; ЧМТ – черепно-мозговая травма.

2. Длительные нарушения сознания как проявление устойчивого патологического состояния

Нами проведен анализ результатов комплексного обследования и лечения 25 больных женского (6 человек) и мужского (19 человек) пола в возрасте от 14 до 58 лет, из которых 22 перенесли тяжелую черепно-мозговую травму, 3 – гипоксию. Пациенты были госпитализированы в отделение реанимации клиники ИМЧ РАН в сроки от 2–6 месяцев (16 больных) и свыше 6 месяцев (9 больных) с момента поражения мозга, при этом у 18 пациентов уровень сознания соответствовал вегетативному и у 7 – малому сознанию. Кроме динамического неврологического, электрофизиологического, допплерографического и магнитно-резонансно томографичекого (МРТ), а также клинико-лабораторного, иммунологического и инфектологического исследований у 16 больных проведено позитронно-эмиссионно томографическое (ПЭТ) исследование (Медведев и др., 2008), из них у 6 – в динамике. Исследования повторяли по мере восстановления уровня сознания у пациентов. Проводимое лечение было направлено на коррекцию выявленных факторов дополнительного повреждения мозга (преимущественно инфекционно-воспалительных иммунозависимых процессов в ЦНС (Вайншенкер и др., 2009) и гипертензионно-гидроцефального синдрома) и проведение комплексной фармако-нейрореабилитационной терапии. У всех пациентов прослежен катамнез не менее 6 месяцев.

При динамическом неврологическом обследовании наблюдались изменения очаговой неврологической симптоматики на каждом новом этапе восстановления сознания. При выходе из комы регрессировали симптомы поражения ствола мозга, в первую очередь – мезенцефального уровня, при выходе из вегетативного состояния менялись пирамидные, экстрапирамидные проявления и их взаимоотношения. Также появлялись или менялись эпилептические приступы или их компоненты.

По данным ЭЭГ, у пациентов в вегетативном состоянии в период расширения уровня сознания на фоне низкоамплитудной, дезорганизованной или медленноволновой активности отмечались паттерны быстрых форм активности, появление очаговой эпилептиформной активности мозга, что соответствовало положительным эффектам, описанным при различного рода электростимуляциях и диазепиновой пробе (Кондратьева, 2004; Климаш, 2005; Медведев, 2008; Tsubokawa et al., 1990; Schiff et al., 2007). Однако сами пробы и прогностические критерии представляются нам не столь однозначными, поскольку в отдельных наблюдениях нами отмечены ложноположительные и ложноотрицательные результаты.

По данным ПЭТ, в сравнении с данными МРТ у пациентов определялись области снижения скорости метаболизма глюкозы (СМГ) не только непосредственно в области обширных поражений, но и перифокально, а также в интактных по данным МРТ областях, что свидетельствует о снижении уровня функциональной активности этих зон.

Сохранный уровень СМГ мог наблюдаться и при наличии морфо-анатомических повреждений на МРТ, в том числе и в стволе. Степень снижения СМГ у всех больных была индивидуальна. Так, при обследовании пациента С., 36 лет, с легкой посттравматической деменцией, который перенес травму 1.5 года назад и 9 меся-

цев находился в вегетативном состоянии, по данным ПЭТ была выявлена грубо диффузно сниженная СМГ в больших полушариях и стволе головного мозга. Отметим, что МРТ и вызванные потенциалы не выявили нарушений в этой области.

При динамическом ПЭТ-исследовании по мере восстановления сознания наблюдалась тенденция к нормализация СМГ при сохранении или уменьшении размеров очага, вплоть до полного его нивелирования. Эти изменения отмечались (данные МРТ) в первую очередь в тех областях мозга, которые не пострадали от первичного повреждающего фактора и были связаны, вероятно, с элиминацией факторов вторичного повреждения мозга. При элиминации всех факторов вторичного повреждения мозга у больных, госпитализированных через 2–6 мес. от воздействия повреждающего фактора, отмечалось улучшение уровня сознания (на 2–4 по шкале Цубокава (Tsubokawa et al., 1990)) за период госпитализации (1–1,5 мес.), а по данным катамнеза – нередко и дальнейшая положительная динамика. При этом чем раньше проводили эффективное лечение, тем чаще наблюдали указанные изменения при ПЭТ-исследовании. Часто это улучшение проявлялось в лобных долях.

У больных в вегетативном состоянии с типичными проявлениями на ЭЭГ (Кондратьева, 2004) предварительный анализ – соотнесение данных МРТ с динамикой нарушений СМГ и изменением степени нарушения сознания – позволил выявить следующие особенности. Нарушение СМГ в стволе мозга (при отсутствии признаков анатомического поражения по данным МРТ) не влияло на возможность восстановления сознания у этих больных. Лучшее восстановление сознания и когнитивных функций у этой группы больных наблюдались при диффузном снижении СМГ в головном мозге, значительно превышающем зоны морфо-анатомических повреждений (МРТ), и при этом исходная степень нарушения СМГ не влияла на прогноз.

Отсутствие (минимальная динамика) восстановления сознания отмечена в случаях, если МГ в головном мозге был достаточно сохранным: минимально выраженное снижение СМГ наблюдалось лишь в отдельных областях больших полушарий мозга, меньших, чем зона повреждений по МРТ. Так, у пациентки Т., 14 лет, 2 года находящейся в вегетативном состоянии, но не остановившейся в своем физическом развитии (менструальный цикл впервые появился на фоне вегетативного состояния), с диффузными посттравматическими изменениями головного мозга в виде множественных посттравматических кист и поражения проводящих путей, СМГ в целом представлялась неизмененной и была лишь легко снижена в теменной доле. На фоне лечения всех рассмотренных выше факторов вторичного повреждения мозга, фармако- и нейрореабилитации за повторные госпитализации удалось достичь лишь минимального временного улучшения (1 балл по шкале Цубокава (Tsubokawa et al., 1990)), в то время как СМГ в теменной доле практически восстановилась. Подчеркнем, что при увеличении числа наблюдений и проведении дополнительного анализа, весьма вероятно, могут быть получены уточняющие и дополняющие сведения.

На первый взгляд, полученные нами данные являются противоречивыми и парадоксальными. Однако описанные результаты становятся объяснимыми, если исходить из того, что вегетативное состояние является во многих случаях проявлени-

ем сформировавшегося в головном мозге устойчивого патологического состояния (УПС) (Бехтерева, 1988). Оно (УПС) сформировалось, вероятно, под воздействием первичного повреждающего фактора (травма, гипоксия и др.) и «закрепилось» в результате действия других факторов повреждения, развивающихся на разных этапах болезни головного мозга. Такое состояние в дальнейшем может подвергаться разбалансировке, в результате чего пациент выходит на новый уровень сознания. При этом включаются старые и формируются новые межнейронные связи, в том числе и патологические, образуя новые УПС, проявляющиеся, в том числе, изменением неврологической симптоматики (Бехтерева, 1988).

В начале своего формирования УПС имело, вероятно, адаптационный характер. При этом дизритмия в диапазоне различных волн и медленноволновая активность, являясь защитной реакцией мозга, играла поначалу положительную роль в угнетении и дезинтеграции очагов поражения. В дальнейшем, эта «активированная защитная реакция» закрепилась матрицей долгосрочной памяти (Бехтерева, 1988) и, перейдя в новое качество, клинически проявилась развитием вегетативного состояния. Исходя из той роли, которую эта же защитная реакция играет в уравновешивании эпилептической активности в эпилептогенезе, факт появления последней в местах разбалансирования «вегетативного» УПС (как один из вариантов), проявляющийся улучшением уровня сознания, представляется ожидаемым.

Рассмотрение вегетативного состояния как УПС в значительной мере объясняет результаты разнообразных проб и критериев, представляющихся ложноотрицательными или ложноположительными. У больных в вегетативном состоянии лучшее восстановление сознания и когнитивных функций наблюдалось при наиболее диффузно сниженной СМГ, превышающей по протяженности зоны морфо-анатомических повреждений в головном мозге по данным МРТ, а худший результат соответствовал минимально выраженному нарушению СМГ. С позиции УПС такой неожиданный результат является вполне объяснимым. Чем грубее и диффузнее нарушен метаболизм (при сохранности анатомических структур), тем хуже «внутренняя функциональная организация» сформировавшегося УПС, слабее матрица его долгосрочной памяти и, соответственно, больше вероятность его разбалансирования.

Полученные результаты согласуются с представлениями Н.П. Бехтеревой о том, что в ряде случаев кома обусловлена разлитым торможением большинства структур головного мозга, выполняющим защитную функцию. В этом случае снижение СМГ связано не со структурными повреждениями, а с функциональным УПС, которое может быть разбалансировано. И наоборот, чем сохраннее представляется СМГ у больных в хроническом вегетативном состоянии, тем более функционально организованным, не зависящим от окружающего, представляется такое УПС, тем меньше вероятность его разбалансирования и тем хуже прогноз для восстановления сознания. По-видимому, это и есть истинное вегетативное состояние. Вероятно, развитие подобного «функционально организованного» ВС связано с индивидуальными особенностями нейропластичности мозга и требует неординарного подхода к лечению. Также складывается впечатление, что для восстановления сознания имеет значение и последовательность «включения» и «выключения» различных областей мозга. Имеющиеся данные позволяют лишь предполагать, что

разбалансировка вегетативного УПС, сопровождающаяся восстановлением сознания, проходит по «релейным звеньям», располагающимся по пути развития мозга в онтогенезе. Полученные нами данные нуждаются в дальнейшей обработке и углубленном анализе. Рассмотрение вегетативного состояния как УПС может значительно упростить разработку оптимальных способов лечения этих пациентов.

3. Маломанифестные инфекции как факторы закрепления устойчивого патологического состояния головного мозга у больных в вегетативном состоянии

У больных в вегетативном состоянии (ВС) после черепно-мозговой травмы, гипоксии или других невоспалительных повреждений ЦНС, в соответствии с определяемыми структурными нарушениями, неврологические проявления принято объяснять первичным повреждением, некробиотическими процессами и нарушением ликворо- и гемодинамики в ЦНС (Кондратьева, 2004), а иммунодефицит, развивающийся у этих пациентов, – как нейрогенный (Горбунов, 1994; Лисяный и др, 2000).

При углубленном исследовании сплошной выборки больных в ВС невоспалительной этиологии у всех пациентов (проходивших лечение в клинике ИМЧ РАН) нами были выявлены хронические маломанифестные инфекции (ММИ) (главным образом хламидии, микоплазмы и ассоциированные с ними вирусы группы герпеса), протекающие с поражением вещества и сосудов головного мозга, что подтверждалось данными углубленного морфологического исследования при аутопсиях (В.А. Цинзерлинг). Была выявлена взаимосвязь этих инфекций с иммунодефицитным состоянием. При санации от ММИ возбудителей отмечалось улучшение неврологического статуса (Вайншенкер и др., 2009, 2011).

Ранее нами было предложено рассматривать ВС как устойчивое патологическое состояние головного мозга (УПС), при этом были выделены два варианта ВС – истинное ВС (окончательный диагноз) и функциональное ВС – УПС с принципиальной возможностью разбалансировки и выходом пациента на более высокий уровень сознания. УПС головного мозга развилось под влиянием первичного повреждающего фактора (травма, гипоксия и др.), и «закрепилось» в результате воздействия вторичных факторов повреждения мозга, а затем – дополнительных, развивающихся в ходе длительной болезни головного мозга. Было показано, что одним из очевидных путей разбалансировки УПС головного мозга является элиминация факторов, продолжающих свое воздействие по закреплению УПС (Вайншенкер и др., 2010).

С учетом широкой распространенности, контагиозности и тропности возбудителей ММИ к веществу и сосудам головного мозга, а также отсутствия типичной клинической картины инфекционно-воспалительного процесса в ЦНС при наличии в мозге ММИ (Вайншенкер и др., 2009) выдвинуто предположение о непосредственном участии ММИ в формировании длительной болезни мозга у больных в ВС как часто встречающегося фактора дополнительного закрепления УПС.

Проведено комплексное динамическое исследование 48 пациентов (м – 32, ж – 16, 14–58 лет), находящихся в ВС и малом сознании невоспалительной этиологии

(последствий травмы ЦНС – 33, гипоксического, токсического поражения ЦНС – 15). Ретроспективно по проводимой антимикробной терапии пациенты были разделены на две группы: основная группа (27 больных) получала лечение от ММИ а также от стандартной банальной микробиоты по клинической необходимости, группа контроля (21 больной) – только от стандартной банальной микробиоты по клинической необходимости.

Работа включала инфектологическое исследование (определение ММИ и стандартной банальной микробиоты в ликворе, крови и соскобах со слизистых носоглотки и коньюнктивы культуральным и ПЦР-методами, подбор антимикробных средств к выявленным ММИ на культуре клеток) и комплексное неврологическое исследование, включающее МРТ с введением контрастного вещества, ПЭТ с 18F-фтордезоксиглюкозой, ЭЭГ, оценку неврологического и психоневрологического статуса по шкале по Loewenstein communication scale (LCS) (Borer-Alafi et al., 2002) и Glasgow Outcome scale (Белова, 2004). Инфекционное и иммунологическое исследования ЭЭГ проводили до, в ходе лечения и после завершения лечения (через 1–3 месяца от начала терапии в зависимости от числа возбудителей). Оценку по LCS и ПЭТ проводили до и после завершения лечения, по Glasgow Outcome scale – в сроки от 6 месяцев до 5 лет после проведения лечения.

При статистическом анализе использовали критерии χ^2, χ^2 с поправкой Йетса и критерия Фишера; критерии Манна-Уитни, Вальда и медианного χ^2.

У всех (48) пациентов в моче и/или мокроте определялась стандартная банальная микробиота. У всех (48) пациентов выявлены различные возбудители ММИ, определяемые в разных биологических материалах и различных сочетаниях, среди которых преобладали *Chlamydia* spp. (у 54% больных в ликворе и у 54% в крови по данным культурального и/или ПЦР-методов исследования) и *Mycoplasma* spp. (21% в ликворе и у 23% в крови), сочетающиеся ($P<0,05$) с *Human herpes virus type 6, Epstein Barr virus* и *Cytomegalovirus*.

Типичных клинических и нейровизуализационных признаков существования ММИ в ЦНС выявлено не было, МРТ выявляло признаки прогрессирующей атрофии мозгового вещества (по данным повторных исследований, проводимых до начала лечения) и лишь у 3 больных выявлено накопление контраста сосудами мягкой мозговой оболочки. В основной группе в результате лечения (в первую очередь санация от *Chlamydia* spp., *Mycoplasma* spp.) наблюдалось не только исчезновение указанных, но и значительное уменьшение остальных ММИ, в отличие от пациентов группы контроля, у которых спектр ММИ существенно не менялся. В процессе лечения у больных основной группы наблюдались случаи перехода «завуалированных» для культурального и/или ПЦР-методов диагностики Chlamydia spp. и других патогенов в «открытые» для диагностики формы. В группе контроля, напротив, при массивном воздействии на банальную бактериальную микробиоту наблюдался переход *Chlamydia* spp. в «завуалированную» форму. Указанные различия были значимы ($P< 0,05$).

При сравнении ближайших результатов лечения (1–3 месяца) были выявлены различия по группам в изменении психоневрологического статуса и коммуникативной активности ($P<0,05$). У пациентов основной группы отмечалось улучше-

ние сознания и коммуникативной активности: прирост по шкале LCS в составил 18,7±13,1 баллов. В контрольной группе прирост был выражен меньше и имелись случаи снижения – 0,2±12,8 баллов. Значимое улучшение в основной группе отмечалось по таким показателям шкалы LCS, как двигательная реактивность, зрительные и слуховые функции ($P<0,01$). У этих больных улучшение коммуникативной активности сопровождалось соответствующими нейрофизиологическими перестройками ($P<0,05$). При исходно низкой биоэлектрической активности (БЭА) в ходе лечения регистрировалось ее временное ухудшение в виде появления быстрых форм активности на ЭЭГ, определяющихся в отдельных областях мозга, с последующей тенденцией к нормализации. Изменения неврологического статуса, по данным топической неврологической диагностики, были сопоставимы с областями изменений БЭА мозга. Положительная динамика коммуникативной активности по шкале LCS сопровождалась ($P<0,05$) улучшением энергетического метаболизма мозга (скорости метаболизма глюкозы) в отдельных областях его снижения по данным ПЭТ. Кроме того, улучшение энергетического метаболизма наблюдалось в зонах, где в ходе лечения отмечалось «ухудшение» БЭА. Отдаленные результаты были значимо лучше у пациентов основной группы ($P<0,05$).

Результаты инфектологического исследования соответствуют раннее полученным нами данным и подтверждают представление о типичности существования ММИ у больных в ВС и малом сознании (Вайншенкер и др., 2011). Установленный факт, что на фоне элиминации ММИ наряду с положительной динамикой неврологического статуса отмечалось улучшение энергетического метаболизма головного мозга (по данным ПЭТ с 18F-фтордезоксиглюкозой), может служить доказательством реализации этих процессов в ЦНС (вероятно, параллельно с другой локализацией). С учетом того, что ММИ-процесс головного мозга не визуализируется при МРТ, где определялись преимущественно признаки прогрессирующей церебральной атрофии, а рассматриваемая инфекция является внутриклеточной, персистирующей и, вероятно, меняет метаболизм инфицированных клеток ЦНС, представляется, что определенную роль в прогрессировании нейродегенеративного процесса у больных в ВС играет и ММИ-процесс. В клинической практике ПЭТ с 18F-фтордезоксиглюкозой может служить патогенетически обоснованным методом визуализации ММИ-процесса в ЦНС.

Рассматривая ВС как УПС мы показали, что при функциональном ВС область сниженного метаболизма глюкозы (ПЭТ) значительно превышает область структурных нарушений (МРТ), а при истинном ВС эти области совпадают (Вайншенкер и др., 2010). При функциональном ВС улучшение уровня сознания и неврологического статуса сопровождается улучшением метаболизма мозга в отдельных зонах его исходного снижения, свидетельствуя о разбалансировке УПС. Это наблюдалось у больных основной группы при лечении ММИ. Изменения ЭЭГ, регистрировавшиеся в ходе лечения, у больных основной группы – появление патологических форм БЭА с тенденцией к очаговости при одновременном улучшении сознания пациентов – также соответствуют представлению о дестабилизации и разбалансировке УПС (Бехтерева, 1988). Топическая сопоставимость областей выявленных изменений метаболизма мозга (ПЭТ), областей, где появилась патологическая БЭА

(ЭЭГ), и неврологических изменений подтверждают представление о разбалансировке УПС при элиминировании ММИ из ЦНС. Клинически указанное соответствие может рассматриваться как проявление «разрешающегося» преимущественно очагового или «мультифокального» вялотекущего энцефалита на фоне этиотропной терапии. Лучшие отдаленные результаты у больных после лечения ММИ подтверждают клиническую значимость имевшейся воспалительной патологии. С учетом вышесказанного, ММИ являются фактором дополнительного закрепления УПС, частым и неспецифическим, реализующим свое патологическое воздействие непосредственно в ЦНС.

ММИ с поражением ЦНС участвуют в формировании длительной болезни мозга у больных в ВС невоспалительной этиологии и являются частым (типичным) и неспецифическим фактором, дополнительно закрепляющим УПС. Целесообразно включать выявление и лечение ММИ в протоколы ведения больных в ВС. ПЭТ с 18F-фтордезоксиглюкозой является патогенетически обоснованным методом ориентировочной визуализации ММИ процесса в ЦНС.

4. Полифункциональность нейронов: блокирование патологической экстремальной афферентации приводит к улучшению высших функций мозга (на примере больных в вегетативном состоянии)

Вегетативное состояние (ВС) – один из вариантов выхода из комы, при котором на фоне бодрствования у пациентов нет признаков осознания себя и окружающего. До последнего времени прогноз выхода из ВС был неизвестен, однако предполагалось, что за внешней схожестью клинических проявлений лежат различные патофизиологические механизмы.

Рассматривая ВС с позиции теории об устойчивом патологическом состоянии (УПС) головного мозга (Бехтерева, 1988), нам впервые удалось показать, что существуют две «маски» ВС: истинная, с неблагоприятным прогнозом, и функциональная, при которой прогноз относительно благоприятный (Вайншенкер и др., 2010). Благоприятный прогноз у функционального ВС обусловлен тем, что стойкое нарушение сознания при этом является следствием именно УПС, которое может быть разбалансировано. В результате этого включаются старые и формируются новые межнейронные связи. Разбалансировка достигается при элиминировании факторов, продолжающих свое патологическое воздействие на ЦНС в ходе болезни мозга – факторов, закрепляющих УПС. Клинически это проявляется в улучшении неврологического статуса пациента.

Среди частых и очевидных клинических составляющих ВС ведущее место занимает грубое и обычно генерализованное повышение мышечного тонуса со спастическими параличами, позно-тоническими реакциями, патологическими позами и с вероятным значительным болевым компонентом. Развитие этих двигательных нарушений первично обусловлено поражением нейронов и их связей в ЦНС. При рассмотрении ВС как проявления УПС нами выдвинуто предположение, что посто-

янная патологическая афферентация со спастически измененных мышц закрепляет УПС головного мозга.

В клинической практике коррекцию мышечной спастики считают исключительно симптоматическим лечением, облегчающим в первую очередь уход за пациентом. В связи с этим выбор методики лечения обычно эмпирический. Чаще прочих применяют различные фармакологические препараты с центральным и/или периферическим действием и пероральным введением (сирдалуд, баклофен, мидокалм и другие в больших дозах и разных сочетаниях). Однако их эффективность часто минимальна, а побочный эффект в виде снижения артериального давления со снижением перфузии головного мозга также ограничивает их применение. В последнее десятилетие в комплексе симптоматических антиспастических (а также антидистонических) мероприятий начали использовать внутримышечное (местное) применение препаратов ботулотоксина, однако ботулинотерапия обычно ограничивается отдельными частями тела и мышечными группами (Dressler, 2011).

Эффект фармакопрепаратов с «центральным» действием не может быть предсказуем с учетом измененной функциональной активности нейронов в структуре УПС. Напротив, эффект ботулотоксина, блокирующего нервно-мышечную передачу в «периферическом органе», в этих условиях является более надежным. Исходя из этого представляется целесообразным применение у больных в ВС для коррекции фармакорезистентной генерализованной спастики с патологическими позами «расширенной» ботулинотерапии с введением ботулотоксина во все спастичные мышцы. С учетом кахексии, воспалительных и иммунопатологических состояний у наших пациентов для введения использовали препарат ботулотоксина, очищенный от комплексообразующих белков – Ксеомин (Xeomin, Merz Pharmaceuticals, Frankfurt|M, Germany) (Dressler, 2011) в суммарной дозе 600–1300 ед. (Вайншенкер и др., 2012) При этом помимо антиспастического эффекта, длительность которого достигала 7–8 месяцев, а в отдельных случаях 10 месяцев, при стабильном состоянии гемодинамики и отсутствии осложнений мы отмечали изменение неврологической симптоматики, в том числе не связанной с двигательными нейронами, а также улучшение уровня сознания и коммуникативной активности пациентов.

У 19 больных на фоне введения Ксеомина базовую терапию не меняли (или ее не было), а другое лечение не проводили. Это дало возможность выделить клинико-неврологические и нейрофизиологические изменения, развивающиеся в головном мозге при нивелировании мышечной спастики на периферическом уровне. За две-три недели наблюдения после введения Ксеомина у всех пациентов отмечалось улучшение следующих показателей: мобильности на 3–6 баллов и ассоциированной с ней альтернативной коммуникации на 3–4 балла, а также зрительной реактивности на 1–5 баллов, слухового восприятия на 2–8 баллов и вербальной коммуникации на 1–2 балла. Параметры оценивались по Loewenstein communication scale – LCS (Borer-Alafi, 2002). Клиническая динамика соответствовала изменениям метаболизма глюкозы в головном мозге, регистрируемым при динамическом ПЭТ исследовании с 18F-фтордезоксиглюкозой (Медведев и др, 2008), которое проводилось за сутки до введения и через две–три недели после введения Ксеомина.

Клинический пример №1. Пациентка К., 38 лет, с диагнозом: Вегетативное состояние. Фармакорезистентная генерализованная спастичность с патологическими позами. ВС стало следствием перенесенной 7 месяцев ранее тяжелой черепно-мозговой травмы (ЧМТ) с первичным поражением базальных ганглиев и ствола на мезенцефальном уровне. Попытки фармакологического воздействия на спастичность были эффективны.

При поступлении в ИМЧ РАН мышечная спастика пациентки соответствовала 4–5 баллам по модифицированной шкале Ашворта (Белова, 2004), а ВС пациентки оценивалось в 8 баллов по шкале LCS. Через 3 недели после введения 800 ед. Ксеомина (другой терапии в этот период не проводили) мышечный тонус снизился до 1–2 баллов, а уровень коммуникативной активности вырос до 20 баллов LCS, что соответствовало переходу в малое сознание. Улучшились такие показатели, как мобильность (общие двигательные реакции, появились попытки поворота головы и глаз, улучшилось глотание), зрительная реактивность (появился моргательный рефлекс, взгляд стал «пробужденный», периодически фиксирует взгляд, пытается следить), слуховое восприятие (появилась реакция на голос, редко попытка выполнить команду). Одновременно с этим, по данным ПЭТ, за три недели наблюдения зафиксировано относительное повышение энергетического метаболизма в мозжечке и стволе головного мозга.

Клинический пример №2. Пациент Ч., 24 года. Малое сознание (выход из ВС). Фармакорезистентная генерализованная спастика с патологической установкой кистей и стоп. Зрительные и глазодвигательные нарушения. Два года назад пациент перенес тяжелую ЧМТ с грубым повреждением лобных, затылочных долей и диффузным аксональным повреждением головного мозга, следствием чего стало ВС (11 баллов по LCS). За 14 месяцев наблюдения и комплексного лечения в ИМЧ РАН в связи со спастикой пациенту дважды проводилась ботулинотерапия. При этом каждый раз отмечалось улучшение в уровне сознания и коммуникации.

При поступлении: малое сознание (60 баллов по LCS), спастика в мышцах дистальных сегментов конечностей – 4 балла, в остальных – 2–3 балла (Модифицированная шкала спастичности Ашворта). Через 2 недели после введения 700 ед. Ксеомина (прочая терапия неизменна три месяца) мышечный тонус снизился, сохраняясь в отдельных мышцах до 2 баллов максимально. Уровень коммуникативной активности суммарно увеличился до 73 баллов по LCS. Повысились следующие показатели: мобильность (улучшились не только произвольные движения конечностями, но и движения головой и глазами, мимических мышц, языка, глотание), зрительная реактивность (появился моргательный рефлекс), слуховое восприятие (улучшилось восприятие команд и узнавание объектов), альтернативная коммуникация (в том числе появился идеаторный и идеомоторный праксис), вербальная коммуникация (улучшилась артикуляция, качество и смысловая нагрузка речевого сообщения). Также улучшились познавательная активность, внимание, расширился эмоциональный диапазон. По данным ПЭТ, за этот период наблюдения выявлено относительное повышение энергетического метаболизма в коре левых височной и теменно-затылочной областей.

Приведенные примеры иллюстрируют клинические проявления изменения (улучшения) функционального состояния не только нейронов и/или межнейронных связей, обеспечивающих движения, но и обеспечивающих зрительные, слуховые, а также высшие психические функции при нивелировании мышечной спастики у пациентов. Такой парадоксальный, на первый взгляд, результат объясним с позиции теории Н.П. Бехтеревой (1971, 1984) об обеспечении сложных видов деятельности структурно-функциональной системой со звеньями различной степени жесткости (система с жесткими и гибкими звеньями), дополненной концепцией о пространственной распределенности этой системы в мозге и ее принципиальной изменчивости во времени (Медведев, Кроль, 1986; Медведев, Пахомов, 1989; Медведев и др., 2008).

Принимая во внимание, что нейроны могут являться элементами двух или более систем и принимать участие в обеспечении различных видов деятельности, поведение конкретного нейрона (или конкретной зоны мозга) не обязательно будет воспроизводимым в измененных условиях (что особенно важно при разбалансировке УПС): нейрон может быть вовлечен в обеспечение другой деятельности, просто не работать или играть другую роль в обеспечении исследуемой деятельности. Вероятно, что при формировании и поддержании мышечной спастики в головном мозге произошло «перепрофилирование» различных нейронов для обеспечения этого одного вида деятельности. Блокирование нервно-мышечной передачи путем введения препарата ботулотоксина в спастические мышцы привело к редукции патологической афферентной и эфферентной гиперактивности двигательных и чувствительных нейрональных цепей. В результате этого, вероятно, в ЦНС произошло «функциональное высвобождение» нейронов, перераспределение их функций по обеспечению других видов деятельности, образование новых межнейронных связей.

В своих последних работах Н.П. Бехтерева (Bechtereva, 2008, 2009) указывала, что посредством формирования в мозге новых межнейронных взаимодействий реализуется «положительная обратная связь: сверхзадача–мозг–состояние организма», исходя из того, что при интенсивной интеллектуальной деятельности, сверхзадаче, состояние здоровья органов и систем организма поддерживается на должном уровне. Данные наших клинических наблюдений, указывающие на «перепрофилирование» нейронов в очевидной связи с нормализацией состояния мышц, в определенной степени являются свидетельством существования этой связи.

С точки зрения клинической медицины следует отметить, что проведение «массированной» ботулинотерапии у больных в ВС и малом сознании следует рассматривать не только как эффективное симптоматическое лечение фармакорезистентной мышечной спастики, но и как физиологически обоснованное и целесообразное опосредованное воздействие на ЦНС, оптимизирующее функциональное состояние ЦНС и расширяющее возможности нейропластичности («опосредованная нейропротекция»).

Таким образом, полученные нами данные выявили улучшение функционального состояния областей головного мозга, обеспечивающих движения, зрительные, слуховые и высшие психические функции (степень улучшения различна) при «пе-

риферическом» уменьшении длительной генерализованной мышечной спастики у больных в вегетативном состоянии.

Эти результаты представляются объяснимыми, если учитывать функциональную изменчивость нейронов: вероятно, редукция патологической афферентной и эфферентной гиперактивности сенсорных и моторных нейрональных цепей привела к «функциональному высвобождению» нейронов, перераспределению их функций по обеспечению других видов деятельности и образованию новых межнейронных связей. Такое «перепрофилирование» нейронов головного мозга, связанное с изменением функционального состояния мышц, в определенной степени является подтверждением существования «положительной обратной связи: сверхзадача–мозг–состояние организма».

5. Заключение

Предложено рассматривать посткоматозные ВС с позиции теории УПС (Н.П. Бехтерева), выделяя истинное ВС с неблагоприятным прогнозом по восстановлению сознания и ВС как функциональное состояние – УПС с принципиальной возможностью восстановления сознания. Визуализируемая область сниженного энергетического метаболизма (ПЭТ) при истинном ВС соответствует только области нейрональной/аксональной гибели (МРТ), а при УПС – кроме этого и снижению уровня активности жизнеспособных нейронов. Выход из ВС (УПС) с улучшением сознания и высших психических функций является результатом разбалансировки УПС с восстановлением способности нейронов к полифункциональной деятельности.

Разбалансировка УПС с восстановлением способности нейронов к полифункциональной деятельности может быть достигнута при элиминации факторов, развившихся в ходе длительной болезни мозга и нарушающих его функциональное состояние. Выделены две группы таких факторов: (1) факторы, нарушающие метаболизм клеток головного мозга, (2) факторы, действующие опосредованно, через механизм функциональной положительной обратной связи «мозг–состояние организма» (Н.П. Бехтерева). Установлено, что ММИ, поражая вещество и сосуды головного мозга, ухудшают метаболизм клеток ЦНС, чем закрепляют УПС мозга и ограничивают возможности нейронов к полифункциональной деятельности. Спастичность оказывает влияние на головной мозг: через патологическую гипер-афферентацию с измененных гипертонусом мышц по механизму положительной обратной связи спастичность нарушает способность нейронов головного мозга к перепрофилированию и дополнительно закрепляет УПС. Элиминация ММИ и редуцирование спастичности на уровне мышц открывает новые возможности восстановления сознания у больных в ВС. Целесообразно включать лечение ММИ (в первую очередь хламидий, микоплазм и патогенных форм бактероидов) и ботулинотерапию с введением препарата ботулотоксина типа А (Ксеомин) во все спастичные мышцы в протоколы и стандарты ведения больных этой категории.

Литература

Белова А.Н. Тесты шкалы и опросники в неврологии и нейрохирургии. М., 2004. 432 с.

Бехтерева Н.П. Нейрофизиологические аспекты психической деятельности человека. М., Л.: Медицина, 1971. 120 с.

Бехтерева Н.П. О гибких и жестких звеньях мозговых систем обеспечения психической деятельности // Нейропсихология. Тексты. Ред. Е.Д. Хомская. М.: МГУ, 1984. С. 28-31

Бехтерева Н.П. Здоровый и больной мозг. 2-е изд., перераб. и дополн. Л.: Наука, 1988. 262 с.

Вайншенкер Ю.И., Ивченко И.М., Нуралова И.В. и др. Хроническая хламидийная инфекция как причина демиелинизации и васкулита центральной нервной системы. Некоторые аспекты диагностики // Вестник СПбГУ. 2009. Вып. 11. № 1. С. 91-98.

Вайншенкер Ю.И., Ивченко И.М., Коротков А.Д. и др. Вегетативное состояние (длительная кома) как проявление устойчивого патологического состояния // Физиология человека. 2010. Т. 36. № 1. С. 138-141.

Вайншенкер Ю.И., Ивченко И.М., Цинзерлинг В.А. и др. Маломанифестные инфекции с поражением ЦНС у больных при длительных бессознательных состояниях невоспалительной этиологии // ЖМЭИ. 2011. № 6. С. 85-89.

Вайншенкер Ю.И., Ивченко И.М., Коротков А.Д., Медведев С.В. Способ лечения спастичности, сопровождающийся улучшением сознания у больных в вегетативном состоянии. Патент РФ №2502503 от 27.12.2013; приоритет 20.11.12.

Горбунов В.И. Иммунные нарушения // Нейротравматология. Справочник. Ред. А.Н. Коновалов, Л.Б. Лихтерман, А.А. Потапов. М.: Вазар-ферро, 1994. С. 78-80.

Климаш А.В. Особенности клиники, диагностики и хирургического лечения травматических поражений ствола головного мозга: Автореф. дисс. канд. мед. наук. СПб., 2005. 24 с.

Кондратьева Е.А. Вегетативное состояние: диагностика, интенсивная терапия, прогнозирование исхода: Автореф. дисс. канд. мед. наук. СПб., 2004. 21 с.

Крыжановский Г.Н. Общая патафизиология нервной системы: руководство. М.: Медицина, 1997. 352 с.

Лисяный Н.И., Руденко В.А., Маркова О.В. и др. Системные и регионарные нейроиммунные процессы при очаговых поражениях ЦНС // Физиология человека. 2000. Т. 26. № 1. С. 92-99.

Медведев С.В. Лечебные электростимуляции при черепно-мозговой травме // Лечебная электрическая стимуляция мозга и нервов человека. Ред. Н.П. Бехтерева. М.: АСТ; СПб.: Сова; Владимир: ВКТ, 2008. С. 211.

Медведев С.В., Кроль Е.М. Некоторые аспекты функционирования динамических систем обеспечения психической деятельности в головном мозге человека // Физиология человека. 1986. Вып. 12. № 4. С. 633-640.

Медведев С.В., Пахомов С.В. Динамическая организация мозговых систем . Л.: Наука, 1989. 250 с.

Медведев С.В., Скворцова Т.Ю., Красикова Р.Н. ПЭТ в России. Позитронно-эмиссионная томография в клинике и физиологии. СПб.: Астрель, 2008. 318 с.

Bechtereva N. The usefulness of psychophysiology in intellectual life. Honorary lecture. 14th world congress of psychophysiology. The Olympics the Brain. September 8-13, St. Petersburg, Russia, 2008, 24 p. (последняя лекция).

Bechtereva N. The usefulness of psychophysiology in the maintenance of cognitive life // Int. J. Psychophys. 2009. Vol. 73. № 2. P. 83-87

Borer-Alafi N., Gil M., Sazbon L., Korn C. Loewenstein communication scale for the minimally responsive patients // Brain injury. 2002. Vol. 16. № 7. P. 593-609.

Dressler D. Five-year experience with incobotulnumtoxin A (Xeomin(®)): the first botulinum toxin drug free of complexing proteins // Eur. J. Neurol. 2011. Vol. 19. № 3. P. 385-389.

Schiff N.D., Giacino J.T., Kalmar K. et al. Behavioural improvements with thalamic stimulation after severe traumatic brain injury // Nature. 2007. Vol. 448. P. 600.

Tsubokawa T., Yamamoto T., Katayama Y. et al. Deep-brain stimulation in a persistent vegetative state: follow up results and criteria for selection of candidates // Brain injury. 1990. Vol. 4. P. 315.

Анализ ассоциации полиморфных вариантов генов-кандидатов с параноидной шизофренией и ответом на типичные нейролептики

А.Э. Гареева, Э.К. Хуснутдинова

Содержание

1. Введение
2. Анализ ассоциации полиморфных вариантов генов, ассоциированных с шизофренией, по данным полногеномных исследований, с риском развития параноидной шизофрении и ответом на нейролептики в популяциях русских и татар из Республики Башкортостан
3. Анализ ассоциаций 48 полиморфных вариантов 6 генов-кандидатов системы нейротрофического фактора (NTRK2, BDNF, NGF, NTRK3), нейрексофилина 1 (NXPH1) и нейрексина 1 (NRXN1) и их гаплотипов с риском развития параноидной шизофрении
4. Заключение

1. Введение

Шизофрения – комплексное полигенно-наследуемое расстройство психики и головного мозга, манифестирующее в результате взаимосочетания предрасполагающих факторов наследственности и среды (психогенных, социогенных, экзогенных) и проявляющееся дезорганизацией и диссоциацией психических функций с развитием спектра психотических симптомов в виде бреда и галлюцинаций, специфическими нарушениями мышления и постепенным формированием эмоционально-волевого и когнитивного дефицита (Мосолов, 2010; Тиганов и др., 1999; Gottesman, Gould, 2003). В 2001 г. Всемирная организация здравоохранения внесла шизофрению в список десяти ведущих причин инвалидности (Tandon et al., 2008).

По данным ВОЗ, 45 млн человек во всем мире страдают шизофренией. Число новых случаев в год составляет 4,5 млн, при этом начало заболевания приходится, как правило, на молодой возраст, что нарушает общественную, профессиональную активность пациента, обусловливает значительное бремя на семью и общество. 70% больных, несмотря на адекватно проводимую поддерживающую терапию, страдают от рецидивов или резидуальных симптомов долгое время. Длительное течение болезни, склонность к рецидивированию и хронизации, относительная

Сокращения: ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; РБ – Республика Башкортостан; ПШ – параноидная шизофрения; ТН – типичные нейролептики; OR – Odds Ratio (отношение шансов); PANSS – шкала позитивных и негативных синдромов; SAS – шкала оценки экстрапирамидного синдрома, вызванного приемом нейролептиков; POSIT – позитивная симптоматика; NEGAT – негативная симптоматика; PSYCH – общепсихопатологическая симптоматика; ЭПС – экстрапирамидный синдром.

эффективность фармакотерапии усугубляет ситуацию. В результате лица, страдающие шизофренией, обнаруживают ту или иную степень социальной недостаточности, ограничение работоспособности или стойкую ее утрату (Гуменюк, Савин, 2010).

Параноидная шизофрения относится к многофакторным заболеваниям, предрасположенность к которым обусловлена сочетанием в генотипе индивида определенных аллельных вариантов генов, формирующих неблагоприятный наследственный фон, реализующийся при взаимодействии с соответствующими факторами окружающей среды, и имеет чрезвычайно сложный этиопатогенез.

Несмотря на определенные успехи в изучении этиологии и патогенеза, а также в поиске эффективных средств фармакотерапии, шизофрения по-прежнему занимает лидирующую позицию в списке патологических состояний центральной нервной системы, приводящих к инвалидизации и социальной дезадаптации больных. Многочисленные молекулярно-генетические исследования показали, что развитие психических и нейродегенеративных заболеваний опосредовано межгенными и ген-средовыми взаимодействиями. Идентификация генов, которые участвуют в развитии нервной системы и формировании психики, а также факторов среды, которые модулируют экспрессию этих генов, является первым шагом в исследовании психических и неврологических заболеваний. К настоящему времени учеными из разных стран выявлено небольшое число генов, демонстрирующих более или менее доказанную связь с риском развития шизофрении (Gupta et al., 2009; Saetre et al., 2008; Schumacher et al., 2009). Однако поиск генов-кандидатов, вовлеченных в этиопатогенез этого заболевания, не завершен. Особый интерес представляют гены системы метаболизма моноаминов и системы нейротрофического фактора, поскольку недавно была показана их вовлеченность в развитие психических и нейродегенеративных заболеваний (Athanasiu et al., 2011; Liu et al., 2012; Otnaess et al., 2009).

До недавнего времени изучение вклада наследственности в развитие психических заболеваний как мультифакториальных заболеваний выполнялось, в основном, в рамках ассоциативных исследований генов-кандидатов, в последние годы, благодаря быстрому совершенствованию технологий массового генотипирования, в мире получили распространение полногеномные ассоциативные исследования (GWAS). В ведущих мировых журналах опубликован целый ряд результатов GWAS, посвященных идентификации новых генетических маркеров, ответственных за наследственную предрасположенность к шизофрении. В настоящее время в результате проводимых полногеномных исследований (GWAS), изучающих вклад как однонуклеотидных замен (SNP), так и вариаций числа копий (CNV) в предрасположенность к развитию шизофрении, выявлены полиморфные маркеры и хромосомные области, сцепленные с шизофренией: 1q21.1, 2p16.3, 2q32.1, 6p21.3-22.1, 15q11.2, 15q13.1 и 15q13.3 (Ikeda et al., 2010; Leonard, Freedman, 2006; Mössner et al., 2010; Stefansson et al., 2008, 2009). Высокая распространенность и неуклонный рост заболеваемости ПШ (параноидная шизофрения**)** во всем мире определяют важное социально-экономическое и медицинское значение этой проблемы, необходимость исследования механизмов развития данного заболевания с целью разработки эффективных методов диагностики, профилактики и патогенетической

терапии с учетом этнической принадлежности и генетических особенностей каждого больного.

Проблема повышения эффективности терапии мультифакториальных психических заболеваний является одной из наиболее актуальных в современной клинической психиатрии, поскольку в условиях применения значительного количества самых разнообразных препаратов выявляются выраженные индивидуальные различия терапевтического эффекта.

Действие лекарства обусловлено его взаимодействием с рецептором. Индивидуальная вариабельность реакции больного на психотропный препарат велика как в отношении общего фармакодинамического эффекта, так и в отношении терапевтической дозы, от нормальной и повышенной чувствительности до полной резистентности к одному и тому же препарату (Середенин, 2004). Выявлены расовые, этнические, половые, географические различия чувствительности к психотропным препаратам (Kim et al., 2008; Pinsonneault, Sadée, 2003; Smeraldi et al., 2006). Более того, существует группа пациентов, у которых развиваются побочные эффекты, вызванные терапией психотропными препаратами, варьирующие от просто приносящих беспокойство до угрожающих их жизни (Malhotra et al., 2004). Нейролептики являются основными препаратами для лечения шизофрении, однако пациенты, получающие нейролептики по-разному отвечают на данные препараты. Биологические предикторы эффективности нейролептиков широко изучаются в мире, и особый упор делается на поиск генетических маркеров.

Таким образом, фармакогенетические подходы не только дают возможность идентифицировать биологические предикторы ответов на психотропные препараты, но и, что более важно, – возможность определять молекулярные субстраты эффективности психотропных препаратов (Malhotra et al., 2004).

Молекулярно-генетические работы, посвященные изучению параноидной шизофрении в России, немногочисленны и затрагивают, в основном, исследование полиморфизма генов нейромедиаторных систем (Галактионова и др., 2012; Гареева и др., 2012; Зайнуллина и др., 2003, 2005).

В результате ранее проведенных исследований в лаборатории молекулярной генетики человека Института биохимии и генетики УНЦ РАН, у больных параноидной шизофренией (ПШ) русских и татар из Республики Башкортостан (РБ) были выявлены генетические маркеры эффективности и риска развития побочных эффектов при приеме нейролептиков по полиморфным локусам *rs1800497* гена *DRD2* и *rs4818*, *rs4680* гена *COMT* (Зайнуллина и др., 2005); кроме того, было установлено, что полиморфные варианты генов *DRD2, SCL6A3, 5-HTT, COMT, G72* являются факторами повышенного и пониженного риска развития параноидной шизофрении.

Полученные результаты свидетельствует об актуальности продолжения поиска фармакогенетических маркеров ответа на нейролептиков и генетических маркеров риска развития параноидной шизофрении в разных этнических группах из РБ.

Целью настоящего исследования явилось изучение полиморфных вариантов генов *PRSS16*, *ZNF804A*, *G72*, *SLC18A1*, *APBA2*, *CHRNA7*, *DISC1*, *NRG1*, *RELN*, *PLXNA2*, *RGS2*, *GRIN2B*, ассоциированных с шизофренией по данным полноге-

номных исследований в популяциях русских и татар из Республики Башкортостан (Ikeda et al., 2010; Kirov et al., 2008; Leonard, Freedman, 2006; Mössner et al., 2010; Okahisa et al., 2011; Stefansson et al., 2008, 2009) и *6* генов-кандидатов системы нейротрофического фактора (*NTRK2, BDNF, NGF, NTRK3*), нейрексофилина 1 (*NXPH1*) и нейрексина 1 (*NRXN1*) у больных параноидной шизофренией и здоровых доноров, проживающих в РБ.

Учитывая неоднородность населения нашей республики в этническом отношении, в исследуемые выборки были включены представители двух наиболее распространенных популяций Башкортостана: русских и татар. Обследованный контингент представлен 608 больными с диагнозом параноидной шизофрении F.20.0xx, согласно международной классификации болезней МКБ-10 ПШ различной этнической принадлежности (274 русских, 334 татарина). Средний возраст больных составил 42,93±11,15 лет.

Исследуемые выборки тестированы по специальному протоколу, включающему такие данные, как пол, возраст, этническая принадлежность, возраст начала заболевания, отягощенность наследственного анамнеза по психическим заболеваниям. От каждого больного было получено подписанное информированное согласие. Данное исследование было одобрено локальным биоэтическим комитетом ИБГ УНЦ РАН.

Продолжительность исследования составила 6 недель. Эффективность нейролептиков у больных шизофренией оценена с использованием шкал позитивных и негативных синдромов (Positive and negative Syndrome Scale, PANSS), разработанная С. Кэй, Л. Оплер и А. Фишбэйн в 1986 г., позволяющая проводить стандартизированную оценку различных векторов психопатологической симптоматики шизофрении – позитивной (POSIT), негативной (NEGAT) и общей психопатологической симптоматики (PSYCH), определять клинический профиль больного и прослеживать динамику состояния в процессе терапии (Середенин, 2004). Эффективность терапии и развитие побочных эффектов оценивали в 1-й день назначения препарата, а затем на 21-й и 45-й дни.

По ответу на терапию нейролептиками больные были поделены на две группы: больных, у которых изменение баллов по шкале PANSS составляло 50% и более, определяли в группу реагирующих на терапию нейролептиками – Респондеры (Responders), остальных больных считали резистентными к ней – Нереспондеры (Non Responders) (Середенин, 2004). Экстрапирамидный синдром (ЭПС) является побочным эффектом, наблюдаемым у 20–30% больных шизофренией при длительном приеме типичных нейролептиков (Bakker et al., 2008; Zai et al., 2007).

Критерием развития острого экстрапирамидного синдрома (ЭПС), вызванного приемом нейролептиков, послужило наличие балла выше 3 по шкале SAS (шкала оценки экстрапирамидного синдрома, вызванного приемом нейролептиков).

Для идентификации генетических маркеров риска развития шизофрении были применены следующие подходы: анализ ассоциаций генов-кандидатов (метод случай–контроль) в этнических группах русских и татар из Республики Башкортостан.

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ: MS Office Excel 2003 [Microsoft], Statistica v.6.0, BIOSTAT (StatSoft, Inc. 2001). При попарном сравнении частот аллелей и геноти-

пов в группах больных и контроля будет использовался критерий χ^2 (P) для таблиц сопряженности 2×2 с поправкой Иэйтса на непрерывность. Сила ассоциаций оценивалась в значениях показателя соотношения шансов Odds Ratio (OR). Анализ сочетаний генотипов и аллелей различных генов проведен с использованием пакета прикладных программ SPSS 13.0. Для анализа межгенных взаимодействий будет использована программа MDR (Multifactor-Dimensionality Reduction) (Ritchie et al., 2001) и ее модифицированная версия, выпущенная позднее, GMDR (Generalized Multifactor-Dimensionality Reduction) (Lou et al., 2007). Расчет показателя D', используемого для оценки неравновесия по сцеплению пары полиморфных локусов, а также определение частот гаплотипов в изученных выборках осуществлялся с помощью программы Haploview v. 4.1 (Barrett et al., 2005).

Проведен анализ ассоциации между значениями по шкалам PANSS и SAS и генотипами (аллелями) больных ПШ русских и татар из РБ с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) (пакет прикладных программ «SPSS v. 13.0») для идентификации генетических маркеров индивидуальной чувствительности к нейролептикам.

ДНК выделяли из периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции (Mathew, 1984). Амплификацию изученных локусов проводили с помощью метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) синтеза ДНК на амплификаторе «Терцик» производства компании «ДНК-технология» (г. Москва). Для амплификации использовали реакционную смесь объемом 25 мкл, которая содержала 2,5 мкл 10×Taq-буфера (67 мМ трис-HCl (pH 8,8), 16,6 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 1,5 мМ $MgCl_2$, 0,01% Tween-20), 0,1 мкг геномной ДНК, смесь dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP по 200 мкМ каждого), 1 ед. ДНК-полимеразы Termus aquaticus (производства фирмы «Силекс», г. Москва) и 5–10 пМ локусспецифичных олигонуклеотидных праймеров. Для определения нуклеотидных замен методом полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) проводили гидролиз амплифицированных фрагментов соответствующей рестриктазой.

Результаты ПДРФ-анализа оценивались путем проведения вертикального электрофореза в 7-процентном полиакриламидном геле с последующим окрашиванием бромистым этидием и визуализацией в проходящем ультрафиолетовом свете.

2. Анализ ассоциации полиморфных вариантов генов, ассоциированных с шизофренией, по данным полногеномных исследований, с риском развития параноидной шизофрении и ответом на нейролептики в популяциях русских и татар из Республики Башкортостан

Нами были исследованы 69 полиморфных локусов генов *PRSS16*, *ZNF804A*, *G72*, *SLC18A1*, *APBA2*, *CHRNA7*, *DISC1*, *NRG1*, *RELN*, *PLXNA2*, *RGS2*, *GRIN2B*.

Исследования Х. Стефансона с соавторами выявили ассоциацию и сцепление 19 геномных локусов с психическими расстройствами в хромосомном регионе

6p21.3 главного комплекса гистосовместимости (MHC1), где идентифицировано 10 генов (Van Winkel et al., 2010).

Ген *PRSS16* (6p21.3–22.1) кодирует протеиназу серина и экспрессируется исключительно в вилочковой железе и локализуется на 6 хромосоме в области главного комплекса гистосовместимости 1 (*MHC1*).

В результате сравнительного анализа распределения частот генотипов и аллелей полиморфного локуса *rs13219354* гена *PRSS16* между группами больных и здоровых нами была обнаружена ассоциация гомозиготного генотипа *PRSS16*T/*T* с риском развития ПШ у русских (χ^2=14,52; P=0,0001; OR=1,69; 95%CI 1,28–2,26) и у татар (χ^2=5,55; P=0,02; OR=1,35; 95%CI 1,06–1,71). Также было показано, что аллель *PRSS16*T* является аллелем риска развития шизофрении у татар (χ^2=4,73; P=0,03; OR=1,26; 95%CI 1,02–1,56) и у русских (χ^2=15,32; P<0,001; OR=1,64, 95%CI 1,25–2,15).

Кроме того, было выявлено, что генотип *PRSS16*C/*T* и аллель *PRSS16*C* являются протективными к развитию ПШ у русских (*PRSS16*C/*T*: χ^2=9,12, P=0,003; OR=0,65, 95%CI 0,49–0,87; *PRSS16*C:* χ^2=15,32; P<0,001; OR=0,61, 95%CI 1,25–2,15) и у татар (*PRSS16*C/*T*: χ^2=4,38; P=0,04; OR=0,76; 95%CI 0,59–0,98; *PRSS16*C*: χ^2=4,73, P=0,03; OR=0,79, 95%CI 0,64–0,98).

Ген, кодирующий цинк-пальцевой белок 804A (*англ*. zinc finger protein 804A) *ZNF804A* (2q32.1), содержащий в своей структуре домен типа «цинковый палец». Функции белка пока неясны. Анализ возможных взаимодействий множества белков с помощью дрожжевой двухгибридной системы (*англ*. yeast two hybrid system) выявил способность белка связываться с N-концом (*англ*. N-terminus) атаксина 1 (*англ*. ataxin 1). Наличие классического C_2H_2 цинк-пальцевого домена позволяет предположить, что белок, кодируемый геном ZNF804A, является фактором транскрипции — регулирует экспрессию генов.

Проведенный нами анализ распределения частот генотипов и аллелей полиморфного локуса *rs1344706* гена *ZNF804A* у больных ПШ и здоровых русских и татар из РБ показал, что генетическими маркерами повышенного риска развития ПШ у русских является генотип *ZNF804A*A/*A* (OR=2,23) полиморфного локуса *rs1344706* гена *ZNF804A*.

При полногеномном исследовании была выявлена ассоциация гена *ZNF804A* с шизофренией у англичан (O'Donavan et al., 2008), однако проведенные позже репликативные исследования показали неоднозначные результаты. Так, Д. Шанз с соавторами не подтвердили ассоциации полиморфного локуса *rs1344706* гена *ZNF804A* у немцев (Dwyer et al., 2010; Schanze et al., 2011). В то же время, результаты настоящего исследования согласуются с данными ряда авторов, показавшими вклад этого полиморфного варианта с шизофренией у европейцев и японцев (Riley et al., 2010; Steinberg et al., 2011; Yasuda et al., 2011).

И. Чумаков с соавторами впервые картировали ген *G72* (13q22–34) и идентифицировали белок, кодируемый геном *G72*, который оказался оксидазой D-аминокислот, метаболизирующий в ЦНС D-серин (D-Ser). D-Ser является нейромодулятором рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA), которые играют важную роль во многих патофизиологических процессах. С геном *G72* перекрывается, транскри-

бирующийся в противоположном направлении ген *G30*. Ранее была показана ассоциация генов *G72* и *G30* со многими психическими расстройствами (Barrett et al., 2005; Gomez et al., 2009; Grigoroiu-Serbanescu et al., 2010; Korostishevsky et al., 2006; Schumacher et al., 2009).

Нами было изучено два полиморфных локуса – *rs3918342* и *rs2391191*, в гене активатора D-аминооксидазы *G72* (13q22–34), локализованного в области, сцепленной с шизофренией (Chumakov et al., 2002; Mössner et al., 2010). Анализ распределения частот аллелей по полиморфному локусу *rs3918342* гена *G72* выявил достоверно более высокую частоту аллеля *G72*C* (χ^2=5,33; df=1, P=0,021; OR=1,49; CI 95% 1,05–2,13) по сравнению с таковой в группе контроля

Ген *SLC18A1* (8p21.3) семейства транспортеров растворенных веществ 18, член 1, кодирующий транспортный белок, переносящий моноаминовые нейротрансмиттеры в везикулярные пузырьки пресинаптического нейрона, локализован в области, сцепленной с шизофренией. Ряд генетических исследований указывают на возможный вклад гена *SLC18A1* в риск развития шизофрении (Lohoff et al., 2008; Malhotra et al., 2004).

Анализ ассоциации аллелей и генотипов полиморфного локуса *rs2270641* гена *SLC18A1* показал, что генетическими маркерами повышенного риска развития ПШ у русских и у татар являются генотип *SLC18A1**A/*A (χ^2=5,69; P=0,02; OR=1,68; CI 95% 1,11–2,52) и аллель *SLC18A1**A (χ^2=5,82; P=0,02; OR=1,49; CI 95% 1,08–2,05).

Анализ ассоциаций ANOVA выявил достоверно значимые различия в баллах по шкале общепсихопатологической симптоматики PSYCH на 21-й оценочный день (F=4,16; P=0,03) за счет повышения средних значений по шкале PSYCH у носителей генотипа *SLC18A1*A/*A* русской этнической принадлежности по сравнению с таковыми, несущими генотип *SLC18A1*C/*C* (P=0,013).

Ген амилоид-связывающего белка *A2 APBA2* (15q11-q12) кодирует белок нейрональной адаптации, необходимый для синаптической передачи, который взаимодействует с геном *NRXN1* на пресинаптической мембране. Г. Киров с соавторами выявили дупликацию в области 15q13.1, затрагивающую три гена, в том числе *APBA2* (Mint2) (Kirov et al., 2008). Однако при исследовании вариаций числа копий и однонуклеотидных замен в генах *NRXN1* и *APBA2* Х. Стефансон и А.С. Нид с соавторами, не обнаружили ассоциации с риском развития шизофрении у европейцев (Need et al., 2009; Stefansson et al., 2008).

Проведенный однофакторный дисперсионный анализ в выборке больных русской этнической принадлежности, показал статистически значимые различия в средних значениях по шкале SAS на 21-й оценочный день SAS21 (F=3,07; P=0,03) между носителями разных генотипов полиморфного локуса *rs8040932* гена *APBA2*. При введении поправки на множественные сравнения Бонферрони было выявлено понижение средних значений у больных, несущих генотип *APBA2*T/*T*, по сравнению с таковыми, несущими генотип *APBA2*C/*C* (P=0,02).

Ген, кодирующий плексин А2 *PLXNA2* (1q32.2), локализован в области, сцепленной с шизофренией, и по данным ряда исследований ассоциируется с риском развития шизофрении (Fujii et al., 2007).

Однофакторный дисперсионный анализ показал различия в средних значениях по шкале позитивной симптоматики POSIT на 21-й оценочный день у носителей разных генотипов по полиморфному локусу *rs1327175* (F=4,23; P=0,03) гена *PLXNA2* и позволил установить генетический маркер повышенной эффективности в отношении позитивной симптоматики у русских и татар, больных ПШ, при приеме ТН (типичные нейролептики): *PLXNA2*G/*G* (P=0,04).

Ген белка, нарушенного при шизофрении 1 *DISC1* (1q42.1), является геном-кандидатом развития шизофрении (Hennah et al., 2003). Одной из важнейших функций белка DISC1 является присоединение нескольких белковых комплексов к моторному белку кинезин-1, переносящему эти комплексы в аксональные окончания. При проведении анализа ассоциаций разными исследователями получены противоречивые результаты. Так, была выявлена ассоциация аллеля *DISC1*T* полиморфного локуса *rs3737597* гена *DISC1* с шизофренией в некоторых европейских популяциях ($p<0,004$) (Hennah et al., 2003; Saetre et al., 2008), тогда как Д.П. Прата с соавторами не выявили ассоциации данного полиморфного локуса с шизофренией в английской популяции (Prata et al., 2011).

Ген нейрорегулин 1 *NRG1* (8p12) локализован в области, сцепленной с шизофренией, и, по данным ряда исследований, ассоциируется с риском развития шизофрении (Kang et al., 2012; Nicodemus et al., 2010). Ген, кодирующий белок рилин *RELN*, (7q22), по данным полногеномного анализа ассоциации, вносит вклад в риск развития шизофрении у евреев (Shifman et al., 2008). Проведенное репликативное исследование подтвердило ассоциацию данного гена с риском возникновения шизофрении у китайцев (Chang et al., 2011).

Нарушение способности к фильтрации сенсорной информации является ранним симптомом шизофрении и связано с активностью гена альфа-7-никотинового рецептора *CHRNA7* (15q13.3), локализованного в области, сцепленной с шизофрений (Flomen et al., 2006; Joo et al., 2010; Leonard, Freedman, 2006).

Проведенное нами исследование показало отсутствие различий в распределении частот генотипов и аллелей по полиморфным локусам *rs8040932* гена *APBA2*, *rs3826029* гена *CHRNA7*, *rs3737597* гена *DISC1*, *rs10503929* гена *NRG1*, *rs7341475* гена *RELN*, *rs1327175* гена *PLXNA2* между группами больных с ПШ и здоровых русских и татар из РБ, а проведенный анализ ассоциаций продемонстрировал отсутствие влияния полиморфных локусов *rs3737597* гена *DISC1*, *rs1344706* гена *ZNF804A*, *rs13219354* гена *PRSS16*, *rs3826029* гена *CHRNA7*, *rs7341475* гена *RELN* в формировании ответа на прием типичных нейролептиков у русских и татар из РБ.

Изучением генов группы белков, регулирующих сигнальную активность G-белка *RGS*, занимаются многие ученые, поскольку они модулируют трансдукцию сигнала рецепторов нейротрансмиттеров (дофамин, глутамат, серотонин, гамма-аминомасляная кислота), играющих роль в патогенезе шизофрении (Okahisa et al., 2011; Réthelyi et al., 2010). Ранее полученные результаты показали снижение экспрессии гена *RGS4* при шизофрении (Mimics et al., 2000). В исследовании Д. Кэмпбела с соавторами была подтверждена вовлеченность ряда полиморфных локусов генов *RGS2* и *RGS5* в риск развития шизофрении (Campbell et al., 2008).

Также была показана ассоциация нескольких полиморфных локусов, расположенных в 5'-нетранслируемой области и в интроне 1 гена *RGS4* с шизофренией (Chowdhari et al., 2002).

Регулятор передачи сигнала *G*-белка (*RGS*) является негативным регулятором рецепторов, связанным с *G*-белками, включая метаботропные глутаматные рецепторы (De Blasi et al., 2001), и, возможно, играет важную роль в развитии нервной системы (De Vries et al., 2000). К. Мимикс с соавторами выявили снижение экспрессии гена *RGS4* у больных шизофренией (Mimics et al., 2000). По мнению ряда авторов, гены этой системы также являются мишенью для нейролептиков (Higa et al., 2010; Klenke, Siffert, 2011). Так, Л. Гринбаум с соавторами выявили протективный эффект аллеля *RGS2*G*, функционального полиморфного локуса *rs4606*, находящегося в 3'области гена *RGS2* для развития ЭПС при приеме нейролептиков у афро-американцев и европейцев (Greenbaum at al., 2012). М. Хига с соавторами не подтвердили влияния данного полиморфного локуса на развитие ЭПС у японцев (Higa et al., 2010).

В гене *RGS2* (*1q31*) было изучено пять полиморфных локусов с риском развития шизофрении *(rs2746073*, *rs2746072*, *rs3767488*, *rs2746071)*. Статистически значимые различия в распределении частот аллелей и генотипов полиморфного маркера *rs2746071* гена *RGS2* были выявлены между группами больных параноидной шизофренией и контролем в зависимости от этнической принадлежности (P>0,05).

В результате сравнительного анализа распределения частот генотипов и аллелей между группами больных и здоровых нами была обнаружена ассоциация гомозиготного генотипа *RGS2*G/*G* полиморфного локуса *rs2746071* с риском развития ПШ у русских (χ^2=9,54, P=0,002; OR= 4,075; 95%CI 1,67–9,89) и у татар (χ^2=24,318; P=0,000001; OR = 4,88; 95%CI 2,55–9,35). Также было показано, что аллель *RGS2*G* является аллелем риска развития шизофрении у татар (χ^2=29,54; P=0,0000; OR=2,51, 95%CI 1,804–3,491) и у русских (χ^2=17,15; P<0,0001; OR= 2,37; 95%CI 1,59–3,56).

Нами был проведен гаплотипический анализ. В группе больных и здоровых русских и татар был сконструирован один гаплотипический блок на основе 5 полиморфных локусов, а именно *rs2746071*, *rs2746072*, *rs2746073*, *rs4606*, *rs3767488*, находящихся в неравновесии по сцеплению как в этнических группах русских (D'>0,80) так и татар (D'>0,59) (рис. 1).

В результате проведенного гаплотипического анализа в группе русских и татар было определено 7 гаплотипов. Было обнаружено, что гаплотип *RGS2*A*G*T*C*T* достоверно чаще встречался в группе здоровых русских (χ^2=22,08, P=0,000003; OR=0,38, 95%CI 0,26–0,57) и татар (χ^2=24,39; P=0,000; OR=0,44; 95%CI 0,32–0,61), чем у больных ПШ. Напротив, частота гаплотипа *RGS2*G*G*T*C*T* была достоверно выше у больных параноидной шизофренией, чем у здоровых русских (χ^2=45,77; P=0,000; OR=21,47; 95%CI 6,59–69,95) и татар (χ^2=53,51; P=0,000; OR=18,72; 95%CI 6,69–52,31). Частоты остальных гаплотипов были схожи у больных ПШ и здоровых индивидов русских и татар.

С целью изучения влияния полиморфных локусов *rs2746071*, *rs2746072*, *rs2746073*, *rs4606*, *rs3767488* гена *RGS2* на эффективность типичных нейролепти-

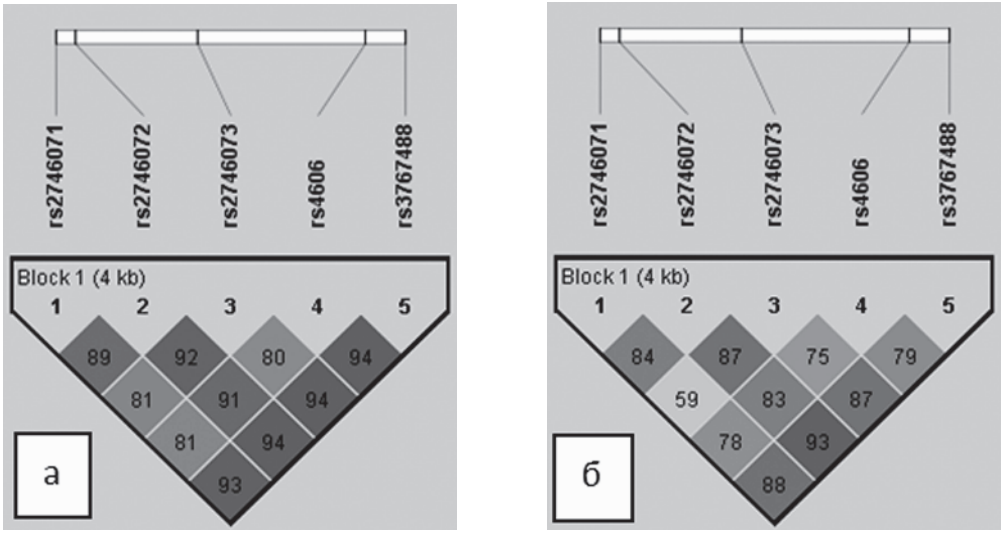


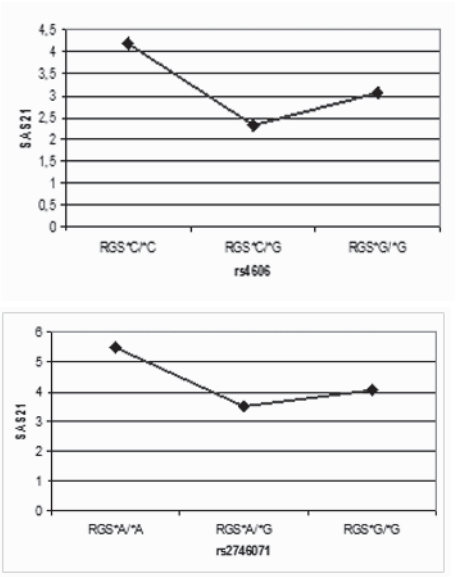
Рис. 1. Неравновесие по сцеплению (D') между полиморфными локусами *rs2746071*, *rs2746072*, *rs2746073*, *rs4606*, *rs3767488*) гена *RGS2*. а) у русских; б) у татар

ков у больных с ПЭШ русских и татар из РБ был проведен однофакторный дисперсионный анализ, показавший различия в средних значениях по подшкале позитивной симптоматики POSIT на 21-й оценочный день у носителей разных генотипов по полиморфному локусу *rs2746072* гена *RGS2* у русских (F=3,75; P=0,03). При введении поправки на множественные сравнения Бонферрони были выявлены понижения средних значений у больных, несущих генотип RGS2**C/*C*, по сравнению с таковыми, несущими генотип *RGS2*G/*G* (P=0,027).

Однофакторный дисперсионный анализ, проведенный для выявления степени риска развития ЭПС в группах русских и татар, показал различия в средних значениях по шкале SAS на 21-й оценочный день у носителей разных генотипов по полиморфному локусу *rs2746073* (F=3,08; P=0,03)*, rs4606* (F=4,52; P=0,01)*, rs2746071* (F=3,87; P=0,03) гена *RGS2* у русских и позволил установить генетические маркеры повышенного риска развития экстрапирамидного синдрома (ЭПС) у больных ПЭШ при приеме ТН: *RGS2*T/*T rs2746073* (P=0,04), *RGS2*C/*C rs4606* (P=0,01), *RGS2*A/*A rs2746071* (P=0,024) у русских (рис. 2).

Анализ вариаций ANOVA на 21-й оценочный день у татар показал статистически значимые различия в средних значениях по подшкале негативной симптоматики NEGAT (F=2,93; P=0,03) по полиморфному локусу *rs4606* гена *RGS2* (F=3,35; P=0,03) за счет понижения средних значений у больных, несущих генотип *RGS2*C/*C* по сравнению с таковыми, несущими генотип *RGS2*G/*G* (P=0,018) и PSYCH по полиморфному локусу *rs2746071* гена *RGS2* (F=3,64; P=0,03) за счет повышения средних значений у больных, несущих генотип *RGS2*A/*A*, по сравнению с таковыми, несущими генотип *RGS2*G/*G* (P=0,015).

С целью выявления фармакогенетических маркеров достаточного терапевтического ответа и маркеров риска развития экстрапирамидного синдрома ЭПС был



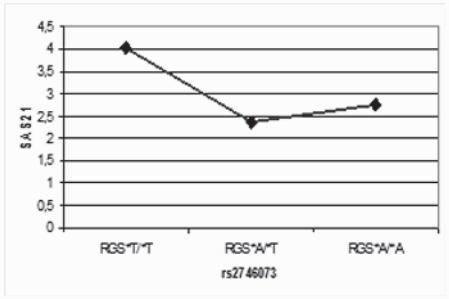


Рис. 2. Генетические маркеры повышенного риска развития экстрапирамидного симптома у русских по полиморфным локусам *rs4606; rs2746073*, *rs2746071* гена *RGS2*

проведен сравнительный анализ распределения частот генотипов и аллелей гена *RGS2* между группой больных Респондеров и Нереспондеров, а также больных с ЭПС и без ЭПС, однако различия оказались статистически не достоверны. Сравнительный анализ распределения частот генотипов и аллелей гена *RGS2* между группой Респондеров и Нереспондеров русских и татар также не показал статистически значимых различий. Анализ неравновесия по сцеплению между пятью маркерами в гене *RGS2* выявил наличие неравновесия по сцеплению (D'>0,67) у татар Респондеров и Нереспондеров (рис. 3).

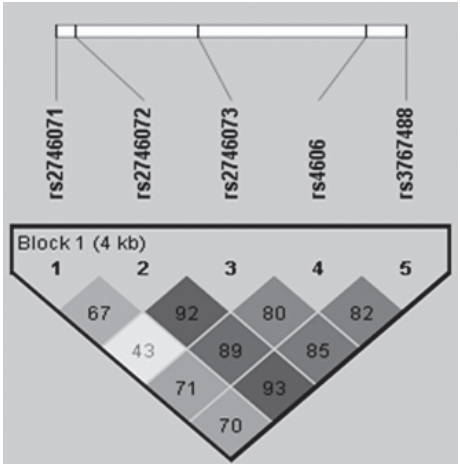


Рис. 3. Неравновесие по сцеплению между пятью маркерами в гене *RGS2* выявило наличие неравновесия по сцеплению (D'>0,67) у татар Респондеров и Нереспондеров

В результате проведенного гаплотипического анализа был сконструирован 1 гаплотипический блок на основе пяти полиморфных локусов гена *RGS2* у татар Респондеров и Нереспондеров, состоящий из 7 гаплотипов. Было обнаружено, что гаплотип *RGS2*G*G*T*C*C* (χ^2=11,02, P=0,001; OR=0,07, 95%CI 0,01–0,36) достоверно чаще встречался в группе татар Респондеров, чем в группе Нереспондеров. Частоты остальных гаплотипов были схожи у Респондеров и Нереспондеров.

Гипоглутаматергическая гипотеза является одной из нейрохимических гипотез патогенеза шизофрении, постулирующая нарушение глутаматного нейромедиаторного пути, привлекающая внимание исследователей в последнее время, о чем свидетельствуют низкие уровни рецепторов глутамата при посмертном анализе мозга больных и способность средств, блокирующих глутаматную активность, таких как фенциклидин и кетамин, вызывать шизофреноподобные симптомы и когнитивные нарушения (Carlsson et al., 2004; Coyle, 2006; Javitt, 2010; Ohtsuki et al., 2001). В связи с изложенным выше, изучение ассоциации полиморфных вариантов гена *GRIN2B* с параноидной шизофренией (ПШ) и с ответом на терапию нейролептиками представляет огромный интерес для исследователей.

Нами была изучена ассоциация шести полиморфных локусов *rs1805502*, *rs1805476*, *rs1805247*, *rs1805482*, *rs7301328*, *rs34315573* гена *GRIN2B* с риском развития шизофрении у русских и татар. В результате проведенного анализа было выявлено, что частота генотипа *GRIN2B*T/*T* (*rs1805247*) была достоверно выше у больных татарской этнической принадлежности, чем у здоровых (χ^2=8,40; P=0,004; OR= 2,32; 95% CI 1,34–4,05). Кроме того, было показано статистически значимое повышение частоты аллеля *GRIN2B*T* (*rs1805247*) у больных татарской (χ^2=10,86; P=0,001; OR=2,38, 95%CI 1,43–3,92) и русской этнической принадлежности (χ^2=4,82; P=0,03; OR=2,03, 95%CI 1,11–3,69). Проведенный анализ ассоциаций не выявил статистически значимых различий в распределении частот генотипов и аллелей по полиморфным локусам *rs1805502*, *rs1805482*, *rs1805476*, *rs7301328*, *rs34315573* гена *GRIN2B* между больными и здоровыми индивидами русской и татарской этнической принадлежности из РБ.

При проведении гаплотипического анализа полиморфных локусов гена *GRIN2B* было сконструировано два гаплотипических блока: блок 1 – *rs1805502*, *rs1805476*, *rs1805247*, *rs1805482*; блок 2 – *rs7301328*, *rs34315573* (рис. 4). При оценке частот гаплотипов гена *GRIN2B* сильное неравновесие по сцеплению между маркерами *rs1805502* и *rs1805476* (D'>0,90), и между *rs7301328* и *rs34315573* (D'~1) было получено как в группе больных и здоровых русских, так и в таковой у татар. На рисунке 4 представлены показатели неравновесия по сцеплению (D') между маркерами

Анализ распределения частот гаплотипов показал, что в этнической группе русских больных частоты гаплотипов первого блока *GRIN2B*T*A*T*C* (χ^2=5,53; P=0,02; OR=1,63; 95%CI 1,10–2,42) и *GRIN2B *C*C*T*C* (χ2=3,9; P=0,05; OR=2,29; 95% CI 1,06-4,94) были достоверно выше таковых в группе контроля. Напротив, гаплотип первого блока *GRIN2B *T*C*T*T* достоверно чаще встречался у здоровых русских, чем у больных (χ^2=3,88; P=0,05; OR=0,58; 95%CI 0,36–0,97). В этнической группе татар был обнаружен протективный маркер – гаплотип первого блока *GRIN2B*C*C*C*C* (χ^2=3,79; P=0,05; OR=0,55; 95%CI 0,31–0,97).

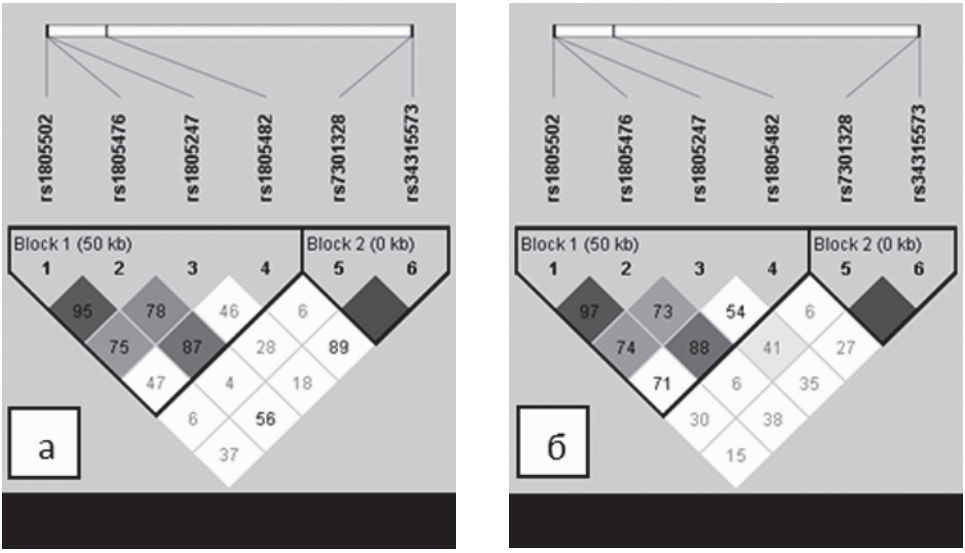


Рис. 4. Неравновесие по сцеплению (D') между полиморфными локусами *rs1805502*, *rs1805476*, *rs1805247*, *rs1805482*, *rs7301328*, *rs34315573* гена *GRIN2B*. а) у русских; б) татар

Проведенный однофакторный дисперсионный анализ в выборке больных русской этнической принадлежности выявил статистически значимые различия в средних значениях по шкале SAS на 21-й оценочный день SAS 21 (F=3,76; P=0,03) между носителями разных генотипов полиморфного локуса *rs18005502* гена *GRIN2B*. При введении поправки на множественные сравнения Бонферрони было выявлено повышение средних значений у больных, несущих генотип *GRIN2B*C/*C*, по сравнению с таковыми, несущими генотипы *GRIN2B*C/*T* и *GRIN2B*T/*T*, однако различия оказались статистически не достоверны (P>0,05).

Анализ вариаций ANOVA выявил достоверно значимые различия в баллах по шкале PANSS у татар (F=5,049; P=0,008) на 21-й оценочный день за счет повышения средних значений по шкале PANSS21 у носителей генотипа *GRIN2B*C/*C* по сравнению с носителями генотипов *GRIN2B*C/*T* (P=0,011) и *GRIN2B*T/*T* (P=0,05); по подшкале общепсихопатологической симптоматики PSYCH21 (F=4,037; P=0,02) на 21-й оценочный день за счет повышения средних значений по PSYCH21 у носителей генотипа *GRIN2B*C/*C*, по сравнению с таковыми, несущими генотип *GRIN2B*C/*T* (P=0,011); по подшкале негативной симптоматики NEGAT21 (F=4,626; P=0,011) на 21-й оценочный день за счет повышения средних значений по NEGAT21 у носителей генотипа *GRIN2B*C/*C*, по сравнению с таковыми, несущими генотип *GRIN2B*C/*T* (P=0,015).

В результате проведенного сравнительного анализа распределения частот генотипов шести полиморфных локусов – *rs1805502*, *rs1805476*, *rs1805247*, *rs1805482*, *rs7301328*, *rs34315573* гена *GRIN2B* между группой Респондеров и Нереспондеров русских и татар было выявлено статистически значимое различие (χ^2=6,82; P=0,033) за счет достоверно более высокой частоты генотипа *GRIN2B*T/*T* по полиморфному локусу *rs34315573* (χ^2=4,65; P=0,031) у русских Нереспондеров.

Сравнительный анализ распределения частот генотипов по шести полиморфным локусам – *rs1805502*, *rs1805476*, *rs1805247*, *rs1805482*, *rs7301328*, *rs34315573* гена *GRIN2B* между группами больных с экстрапирамидным синдромом (ЭПС) и больных без ЭПС у русских и у татар не выявил статистически значимых различий.

3. Анализ ассоциаций 48 полиморфных вариантов 6 генов-кандидатов системы нейротрофического фактора (NTRK2, BDNF, NGF, NTRK3), нейрексофилина 1 (NXPH1) и нейрексина 1 (NRXN1) и их гаплотипов с риском развития параноидной шизофрении

Особый интерес при изучении предрасположенности к параноидной шизофрении представляют гены системы нейротрофического фактора: *NGF* (1p13.1) – фактор роста нервов, *BDNF* (11p13) – нейротрофический фактор головного мозга, *NTRK2* (9q22.1) – тирозинкиназный рецептор TrkB, *NTRK3* (15q25) – тирозинкиназный рецептор TrkC, а также гены нейрексофилина 1 *NXPH1* (7p22) и ген нейрексина 1 *NRXN1* (2p16.3), поскольку недавно была показана их вовлеченность в формирование предрасположенности к различным аффективным расстройствам (Otnaess et al., 2009; Athanasiu et al., 2011).

Нами была проведена оценка неравновесия по сцеплению между 48 полиморфными локусами в генах *NGF, BDNF, NTRK2, NTRK3, NXPH1, NRXN1*. Локусы, показавшие неравновесие по сцеплению, были объединены в гаплотипические блоки. При проведении гаплотипического анализа полиморфных локусов гена нейротрофического фактора головного мозга *BDNF* был сконструирован гаплотипический блок, состоящий из полиморфных локусов *rs2203877*, *rs7124442*, *rs6265*, *rs10767665*, *rs1491850* (рис. 5).

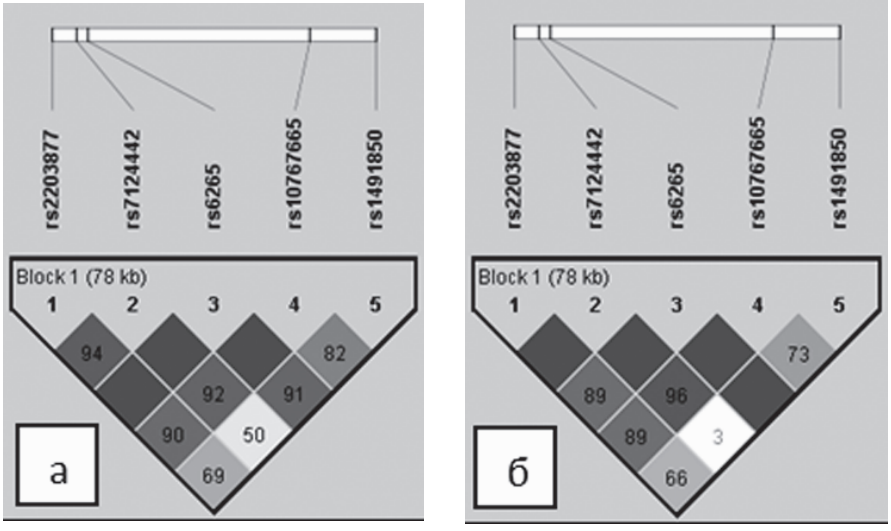


Рис. 5. Неравновесие по сцеплению (D') между полиморфными локусами *rs2203877*, *rs7124442*, *rs6265*, *rs10767665*, *rs1491850* гена *BDNF*. а) у русских; б) у татар

Частота гаплотипа *BDNF*T*C*G*G*T* была достоверно ниже как в общей выборке больных (русских и татар) (χ^2=10,472; P=0,0012; OR=0,39), так и у больных русской (χ^2=4,456; P=0,0348; OR=0,37) и татарской (χ^2=4,235; P=0,039; OR=0,43) этнической принадлежности по сравнению с таковой у здоровых индивидов. Сравнительный анализ распределения частот генотипов и аллелей показал, что аллель *BDNF*C* полиморфного локуса *rs2203877* встречался достоверно чаще в общей выборке больных по сравнению с таковой у здоровых индивидов (χ^2=4,456; P=0,0348; OR=0,37).

Изучение шести полиморфных вариантов гена тирозинкиназного рецептора *TrkB* (*NTRK2*) показало, что аллель *NTRK2*C* полиморфного локуса *rs1443445* является маркером риска развития ПШ у русских (χ^2=5,093; P=0,024; OR=1,77). Исследование распределения частот аллелей и генотипов полиморфных локусов гена тирозинкиназного рецептора *TrkB* (*NTRK3*) выявило маркеры риска развития ПШ: по полиморфному локусу *rs1946698* – аллель *NTRK3*G* у русских и татар (χ^2=12,316, P=0,0004, OR=1,77); у русских (χ^2=17,164; P=0,000034; OR=2,62); по полиморфному локусу *rs7170062* – аллель *NTRK3*T* у русских и татар (χ^2=13,437; P=0,0002; OR=1,77); у русских (χ^2=17,208; P=0,000033; OR=2,59); по полиморфному локусу *rs 11631508* – аллель *NTRK3*A* у русских и татар (χ^2=9,439; P=0,0021; OR=1,83); у русских (χ^2=8,485; P=0,0036; OR=2,18).

При проведении анализа гаплотипов гена тирозинкиназного рецептора *TrkC* (*NTRK3*) был сконструировано два гаплотипических блока (рис. 6): блок 1 – *rs 1435402*, *rs 1946698*, *rs 7170062*, *rs 11631508, rs 12594283*, блок 2 – *rs 3825884*, *rs 1110306*, *rs 11073767*, *rs 11629691*, *rs 7176520*. Гаплотип *NTRK3*T*G*T*A*A** гаплотипического блока 1 встречался достоверно чаще как в общей выборке больных ПШ (русских и татар) (χ^2=8,938; P=0,0028; OR=1,66), так и у больных русской этнической принадлежности (χ^2=10,471; P=0,00012; OR=2,25). Полногеномный анализ сцепления показал, что хромосомный регион 15q25,3-q26,2, в котором находится ген *NTRK3,* сцеплен с шизофренией и депрессивными расстройствами (Feng et al.,

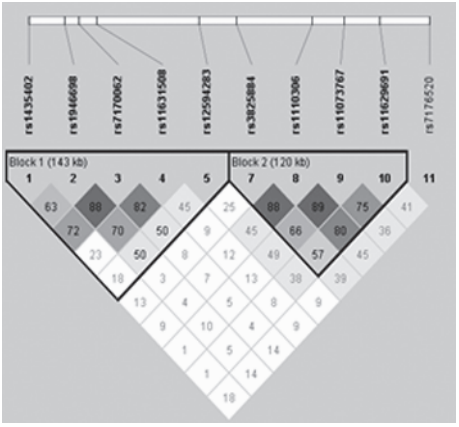


Рис. 6. Неравновесие по сцеплению (D') между полиморфными локусами *rs1435402*, *rs1946698*, *rs7170062*, *rs11631508, rs12594283* гена *NTRK3* у русских

2006; Need et al., 2009). Полученные нами данные подтверждают вовлеченность гена *NTRK3* в формирование предрасположенности к ПШ.

Исследование распределения частот аллелей и генотипов полиморфных локусов гена нейроксофилина 1 (*NXPH1*) показало, что аллель *NXPH1*A* полиморфного локуса *rs886505* является маркером риска развития ПШ у русских и татар (χ^{22}=4,419; P=0,0356; OR=1,52), а аллель *NXPH1*G* полиморфного локуса *rs 7801099* является маркером риска развития данного заболевания у русских (χ^2=9,149; P=0,0025; OR=2,26) (рис.7).

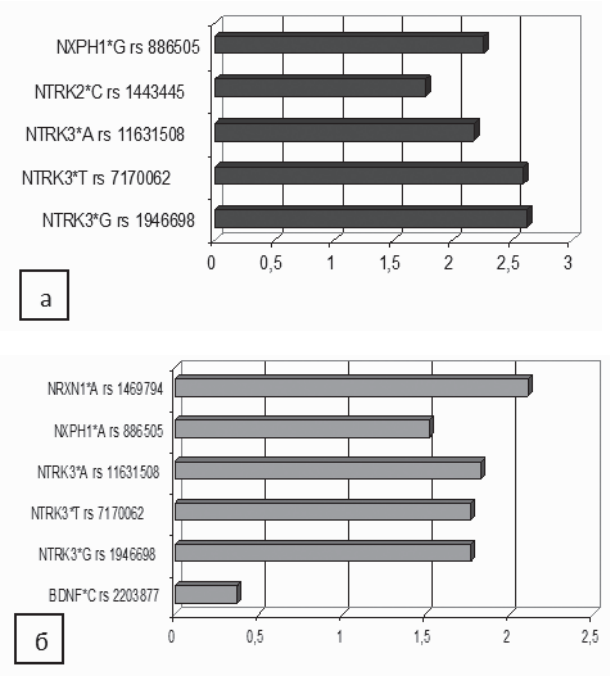


Рис. 7. Маркеры повышенного и пониженного риска развития параноидной шизофрении у русских

В результате проведенного анализа распределения частот аллелей и генотипов полиморфных локусов гена нейрексина 1 (*NRXN1*) было обнаружено, что частота аллеля *NRXN1*A* полиморфного локуса *rs1469794* в общей выборке больных (русских и татар) была достоверно выше таковой у здоровых индивидов (χ^2=11,277; P=0,0008; OR=2,11), также данный аллель *NRXN1*A* является маркером риска развития ПШ у татар (χ^2=10,372; P=0,0013; OR=2,75) (см. рис. 7).

Генетические маркеры риска развития параноидной шизофрении по трем изученным полиморфным локусам гена фактора роста нервов *NGF* не выявлены.

Развитие такого мультифакториального заболевания, как шизофрения, опосредовано аддитивными и эпистатическими взаимодействиями генетических факторов и модулирующим влиянием средовых факторов (Ebstein, 2006). Поскольку

ранее было постулировано, что вклад каждого генетического маркера в развитие предрасположенности к психическим расстройствам составляет менее 1%, а роль наследственности в формировании этого психического расстройства достигает 40–70% (Owen, 2012), для выявления роли генетического компонента в развитии шизофрении необходимо совместное исследование более 50 кандидатных генов с учетом факторов окружающей среды.

В результате анализа межгенных взаимодействий 48 полиморфных локусов 6 генов нейротрофической системы мозга в детерминации риска развития ПШ в этнических группах русских и татар из РБ были установлены две модели межгенных взаимодействий: 1) *NRXN1* (*rs2678228*)* *NXPH1* (*rs6952939*) у русских и татар (χ^2=11,39; P=0,000074; OR=2,093); 2) *NXPH1* (*rs10272916*)* *NTRK3* (*rs11631508*) у татар (χ^2=10,81; P=0,001; OR=5,574).

Таким образом, исследование полиморфных вариантов генов-кандидатов параноидной шизофрении в популяциях русских и татар в Республике Башкортостан выявило выраженные межэтнические различия изучаемых групп по распределению частот аллелей и генотипов полиморфных локусов генов *PRSS16*, *ZNF804A*, *G72*, *SLC18A1*, *APBA2*, *CHRNA7*, *DISC1*, *NRG1*, *RELN*, *PLXNA2*, *RGS2*, *GRIN2B*, *NTRK2, BDNF, NGF, NTRK3*, *NXPH1*, *NRXN1* и генетическим факторам риска развития данного заболевания. Установлено, что генетическими маркерами 1) повышенного риска развития ПШ являются: а) у русских и у татар: генотип *PRSS16*T/*T*, аллель *PRSS16*T* полиморфного локуса *rs13219354* гена *PRSS16*; генотип *SLC18A1*A/*A* и аллель *SLC18A1*A* полиморфного локуса *rs2270641* гена *SLC18A1*; аллель *BDNF*C* полиморфного локуса *rs2203877*; аллель *NTRK3*G* полиморфного локуса *rs1946698* гена *NTRK3*; аллель *NTRK3*T* полиморфного локуса *rs7170062* гена *NTRK3*; аллель *NTRK3*A* полиморфного локуса *rs11631508* гена *NTRK3*; аллель *NRXN1*A* полиморфного локуса *rs1469794* гена *NRXN1*; аллель *NXPH1*A* полиморфного локуса *rs886505* гена *NXPH1*; гаплотип *BDNF*T*C*G*G*T* (*rs 2203877*, *rs 7124442*, *rs 6265*, *rs 10767665*, *rs 1491850*); б) у русских: аллель *G72*C* полиморфного локуса *rs3918342* гена *G72* (*DAOA*); генотип *ZNF804A*A/*A* полиморфного локуса *rs1344706* гена *ZNF804A*; гаплотипы *GRIN2B*T*A*T*C* и *GRIN2B*C*C*T*C* по полиморфным локусам rs1805502, rs1805476, rs1805247, rs1805482 и *rs1805482* гена *GRIN2B*. аллель *NTRK2*C* полиморфного локуса *rs1443445* гена *NTRK2*; аллель *NXPH1*G* полиморфного локуса *rs7801099* гена *NXPH1*; в) у татар: генотип *GRIN2B*T*/*T* и аллель *GRIN2B*T* полиморфного локуса *rs1805247* гена *GRIN2B*. 2) пониженного риска развития ПШ являются: а) у русских и татар: аллель *PRSS16*C* полиморфного локуса *rs13219354* гена *PRSS16*; б) у татар: гаплотип *GRIN2B*C*C*C*C* по полиморфным локусам rs1805502, rs1805476, rs1805247, rs1805482 и *rs1805482* гена *GRIN2B*. 3) эффективности типичных нейролептиков (ТН) в отношении позитивной симптоматики (ПС): генотип *RGS2*C/*C* по полиморфному локусу *rs2746072* гена RGS2 у русских; *PLXNA1*G/*G* у русских и татар; в отношении негативной симптоматики (НС): *RGS2*C/*C* (*rs4606*) у татар. 4) низкой эффективности терапии шизофрении ТН в отношении психопатологической симптоматики: *SLC18A*A/*A* (*rs2270641*) у русских; *RGS2*A/*A* (*rs2746071*); *GRIN2B*C/*C* (*rs1805502*) у татар; в отношении НС: *GRIN2B*C/*C* (*rs1805502*) у

татар. 5) повышенного риска развития экстрапирамидного синдрома (ЭПС) у больных ПШ при приеме ТН являются генотипы: *RGS2*T/*T rs2746073*, *RGS2*C/*C* (*rs4606*), *RGS2*A/*A* (*rs2746071*) у русских. 6) генетическим маркером пониженного риска развития ЭПС является генотип *APBA2*T/*T* (*rs8040932*) у татар.

Результаты настоящего исследования раскрывают некоторые патогенетические аспекты шизофрении и вносят вклад в общее представление о молекулярно-генетических основах развития данного заболевания, что в будущем будет иметь огромное значение для ранней диагностики шизофрении и разработки новых лекарственных средств для ее лечения. Выявленные результаты не претендуют на исчерпывающую характеристику молекулярно-генетических основ параноидной шизофрении, но являются важным шагом на пути понимания механизмов формирования данного психического расстройства.

4. Заключение

Шизофрения является многофакторным заболеванием, на развитие которого оказывают влияние как средовые (социальные), так и генетические факторы. Генетическая предрасположенность к параноидной шизофрении формируется за счет взаимодействия множества генов. Во всем мире активно исследуются ассоциации полиморфных вариантов генов-кандидатов ПШ с фенотипическими проявлениями заболевания.

В рамках настоящего исследования проведен анализ молекулярно-генетических основ формирования параноидной шизофрении у русских и татар из РБ. Нами было изучено 68 полиморфных локусов генов *PRSS16*, *ZNF804A*, *G72*, *SLC18A1*, *APBA2*, *CHRNA7*, *DISC1*, *NRG1*, *RELN*, *PLXNA2*, *RGS2*, *GRIN2B*, *NTRK2, BDNF, NGF, NTRK3*, *NXPH1*, *NRXN1*, относящихся к системам главного комплекса гистосовместимости, сигнальной трансдукции, транспортеров нейротрансмиттеров, нейрональной адаптации, нейротрофического фактора, нейроксифилина и нейрексина, глутаматергической системы, и проведен поиск ассоциаций данных полиморфных маркеров с риском развития параноидной шизофрении и ответом на типичные нейролептики у русских и татар из РБ.

В результате проведенного исследования выявлены факторы повышенного и пониженного риска развития параноидной шизофрении и генетические маркеры эффективности терапии и риска развития побочных эффектов при приеме типичных нейролептиков в РБ.

Полученные нами результаты показали межэтнические различия генетических факторов риска ПШ и формирования ответа на терапию типичными нейролептиками, еще раз подчеркнув важность и необходимость применения популяционного подхода при проведении подобных исследований. Высокая распространенность и неуклонный рост заболеваемости параноидной шизофренией во всем мире характеризует ПШ как глобальную медико-социальную проблему и диктует необходимость ее дальнейшего всестороннего изучения, включающего анализ и генетических, и внешнесредовых факторов, с целью выявления факторов повышенного и

пониженного риска развития заболевания для разработки профилактических мероприятий.

Таким образом, полученные нами данные представляют интерес для понимания молекулярно-генетических механизмов развития параноидной шизофрении, а также позволяют предложить новые направления в разработке методов лечения, диагностики и формирования групп риска данной патологии. Выявление новых генетических маркеров риска заболевания и фармакогенетических маркеров ответа не терапию способствуют внедрению молекулярно-генетических тестов в реальную клиническую практику. Данные об ассоциации определенных генотипов и аллелей локусов генов *PRSS16*, *ZNF804A*, *G72*, *SLC18A1*, *APBA2*, CHRNA7, *PLXNA2*, *RGS2*, *GRIN2B*, *NTRK2, BDNF, NTRK3*, *NXPH1*, *NRXN1* с развитием параноидной шизофрении и эффективностью терапии нейролептиками у русских и татар позволят использовать генотипирование по этим локусам для определения риска развития заболевания с учетом этнической принадлежности.

Литература

Галактионова Д.Ю., Гра О.А., Низамутдинов И.И. и др. Анализ ассоциации полиморфизма генов HTR2A, BDNF и SLC6A4 с развитием параноидной формы шизофрении и суицидального поведения с помощью биочипов. // Журнал неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. 2012. № 10. С. 39-44.

Гареева А.Э., Закиров Д.Ф., Ахмерова И.Ю., Валинуров Р.Г., Хуснутдинова Э.К. Изучение ассоциации полиморфных вариантов генов DRD2, COMT и GNB3 с ответом на типичные нейролептики // Молекулярная медицина. 2012. № 2. С. 33-38.

Гуменюк Л.Н., Савин А.А. Первый психотический эпизод шизофрении как медико-социальная проблема // Биотехнология. 2010. Т. 14. № 2 (51). С. 27-33.

Зайнуллина А.Г, Бикбулатова С.Р., Юрьев Е.Б., Хуснутдинова Э.К. Ассоциация полиморфных маркеров hSERT и SLC6A4 гена переносчика серотонина с шизофренией у больных разной этнической принадлежности // Молекулярная биология. 2003. Т. 37. № 4. С. 1-6.

Зайнуллина А.Г., Гайсина Д.А., Юрьев Е.Б., Хуснутдинова Э.К. Изучение ассоциаций полиморфных ДНК-локусов серотонинергической нейромедиаторной системы с риском развития шизофрении // Медицинская генетика. 2005. Т. 4. № 3. С. 123-127.

Мосолов С.Н. Некоторые актуальные теоретические проблемы диагностики, классификации, нейробиологии и терапии шизофрении: сравнение зарубежного и отечественного подходов // Журнал неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. 2010. № 6. С. 4-11.

Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. М.: Медицинское информационное агентство, 2004. 303 с.

Тиганов А.С., Снежневский А.В., Орловская Д.Д. Руководство по психиатрии. М.: Медицина, 1999. Т. 1. 712 с.

Athanasiu L., Mattingsdal M., Melle I., Andreassen O.A. et al. Intron 12 in NTRK3 is associated with bipolar disorder. // Psychiatry Res. 2011. Vol. 185. № 3. P. 358-362.

Bakker P.R., van Harten P.N., van Os J. Antipsychotic-induced tardive dyskinesia and polymorphic variations in COMT, DRD2, CYP1A2 and MnSOD genes: a meta-analysis of pharmacogenetic interactions // Mol. Psychiatry. 2008. Vol. 13. № 5. P. 544-556.

Barrett J.C., Fry B., Maller J., Daly M.J. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps // Bioinformatics. 2005. Vol. 21. № 2. P. 263-265.

Campbell D.B., Lange L.A., Skelly T., Sullivan P.F. et al. Association of RGS2 and RGS5 variants with schizophrenia symptom severity // Schizophr. Res. 2008. Vol 101. № 1-3. P. 67-75.

Carlsson M.L., Carlsson A., Nilsson M. Schizophrenia: from dopamine to glutamate and back // Curr. Med. Chem. 2004. Vol. 11. № 3. P. 267-277.

Chang L.H., *Li M., Luo X.J., Liu X.Y. et al.* Association of RELN promoter SNPs with schizophrenia in the Chinese population // Dongwuxue Yanjiu. 2011. Vol. 32. № 5. P. 504-508.

Chowdhari K., Mimics K., Semwal P. Association and linkage analyses of RGS4 polymorphisms in schizophrenia // Hum. Mol. Genet. 2002. Vol. 111. P. 1373-1380.

Chumakov I., Blumenfeld M., Guerassimenko O. Genetic and physiological data implicating the new human gene G72 and the gene for D–amino acid oxidase in schizophrenia // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99. P. 13675-13680.

Coyle J.T. Glutamate and schizophrenia: beyond the dopamine hypothesis // Cell. Mol. Neurobiol. 2006. Vol. 26. № 4-6. P. 365-384.

De Blasi A., Conn P.J., Pin J–P., Nicoletti F. Molecular determinants of metabotropic glutamate receptor signalling // Trends Pharmacol. Sci. 2001. Vol. 22. P. 114-120.

De Vries L., Zheng B., Fischer T. The regulator of G protein signalling family. //Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2000. Vol. 40. P. 235-271.

Dwyer S., Williams H., Holmans P., Moskvina V., et al. No evidence that rare coding variants in ZNF804A confer risk of schizophrenia // Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. 2010. Vol. 153B. № 8. P. 1411-1416.

Ebstein R.P. The molecular genetics architecture of human personality: beyond self-report questionnaires // Mol. Psychiatry. 2006. Vol. 11. № 5. P. 427-445.

Feng J., Schroer R., Yan J., Song W. et al. High frequency of neurexin 1beta signal peptide structural variants in patients with autism // Neurosci. Lett. 2006. Vol. 409. № 1. P. 10-13.

Flomen R.H., Collier D.A., Osborne S., Munro J. Association study of CHRFAM7A copy number and 2 bp deletion polymorphisms with schizophrenia and bipolar affective disorder // Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. 2006. Vol. 141B. № 6. P. 571-575.

Fujii T.., Iijima Y.., Kondo H.., Shizuno T. et al. Failure to confirm an association between the PLXNA2 gene and schizophrenia in a Japanese population. // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psych. 2007. Vol. 31. № 4. P. 873-877.

Gomez L., Wigg K., Feng Y., Kiss E. et al. G72/G30 (DAOA) and juvenile-onset mood disorders // Am. J. Med. Genet. B: Neuropsychiatr. Genet. 2009. Vol. 5. № 7. P. 1007-1012.

Gottesman H., Gould T. The endophenotype concept in psychiatry: etymology and strategic intentions // Am. J. Psychiatry. 2003. Vol. 160. № 4. P. 636-645.

Greenbaum L., Lifschytz T., Zozulinsky P., Kohn Y. et al. Alteration in RGS2 expression level is associated with changes in haloperidol induced extrapyramidal features in a mutant mouse model // Eur. Neuropsychopharmacol. 2012. Vol. 22. № 5. P. 379-386.

Grigoroiu-Serbanescu M., Herms S., Diaconu C.C., Jamra R.A. et al. Possible association of different G72/G30 SNPs with mood episodes and persecutory delusions in bipolar I Romanian patients // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2010. Vol. 34. № 4. P. 657-663.

Gupta M., Bhatnagar P., Grover S., Bhasin Y., et al. Association studies of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene with schizophrenia and response to antipsychotic treatment // Pharmacogenomics. 2009. Vol. 10. № 3. P. 385-397.

Hennah W., Varilo T., Kestilä M., Paunio T. et al. Haplotype transmission analysis provides evidence of association for DISC1 to schizophrenia and suggests sex-dependent effects // Hum. Mol. Genet. 2003; Vol. 12. № 23. P. 3151-3159.

Higa M., Ohnuma T., Maeshima H., Hatano T. et al. Association analysis between functional polymorphism of the rs4606 SNP in the RGS2 gene and antipsychotic-induced Parkinsonism in Japanese patients with schizophrenia: results from the Juntendo University Schizophrenia Projects (JUSP) // Neurosci. Lett. 2010. Vol. 18. № 469(1). P. 55-59.

Ikeda M., Aleksic B., Kirov G., Kinoshita Y. et al. Copy number variation in schizophrenia in the Japanese population // Biol. Psychiatry. 2010. Vol. 67. № 3. P. 283-286

Javitt D.C. Glutamatergic theories of schizophrenia // Isr. J. Psychiatry Relat. Sci. 2010. Vol. 47. № 1. P. 4-16.

Joo E.J., Lee K.Y., Kim H.S., Kim S.H. et al. Genetic Association Study of the Alpha 7 Nicotinic Receptor (CHRNA7) with the Development of Schizophrenia and Bipolar Disorder in Korean Population // Psychiatry Investig. 2010. Vol. 7. №. 3. P. 196-201.

Kang C., Yang X., Xu X., Liu H. et al. Association study of neuregulin 1 gene polymorphisms with auditory P300 in schizophrenia // Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet. 2012. Vol. 159B. № 4. P. 422-428.

Kim B., Choi E.Y., Kim C.Y., et al. Could HTR2A 102T>C and DRD3 Ser9Gly predict clinical improvement in patients with acutely exacerbated schizophrenia? Results from treatment responses to risperidone in a naturalistic setting // Hum. Psychopharmacol. 2008. Vol. 23. № 1. P. 61-67.

Kirov G., Gumus D., Chen W. et al. Comparative genome hybridization suggests a role for NRXN1 and APBA2 in schizophrenia // Hum. Mol. Genet. 2008. Vol. 17. № 3. P. 458-465.

Klenke S., Siffert W. SNPs in genes encoding G proteins in pharmacogenetics // Pharmacogenomics. 2011. Vok. 12. № 5. P. 633-654.

Korostishevsky M., Kremer I., Kaganovich M. Transmission disequilibrium and haplotype analyses of the G72/G30 locus: suggestive linkage to schizophrenia in Palestinian Arabs living in the North of Israel // Am. J. Med. Genet. B: Neuropsychiatr. Genet. 2006. Vol. 141B. № 1. P. 91-95.

Leonard S., Freedman R. Genetics of chromosome 15q13-q14 in schizophrenia // Biol. Psychiatry. 2006. Vol. 69. № 2. P. 115-122.

Liu Z.W., Liu J.L., An Y., Zhang L., Wang Y.M. Association between Ser311Cys polymorphism in the dopamine D2 receptor gene and schizophrenia risk: a meta-analysis in Asian populations // Genet. Mol. Res. 2012. Vol. 11. № 1. P. 261-270.

Lohoff F.W., Weller A.E., Bloch P.J., Buono R.J. et al. Association between polymorphisms in the vesicular monoamine transporter 1 gene (VMAT1/SLC18A1) on chromosome 8p and schizophrenia // Neuropsychobiol. 2008, Vol. 57. № 1-2. P. 55-60.

Lou X.Y., Chen G.B., Yan L. et al. A generalized combinatorial approach for detecting gene-by-gene and gene-by-environment interactions with application to nicotine dependence // Am. J. Hum. Genet. 2007. Vol. 80. № 6. P. 1125-1137.

Malhotra A.K., Murphy G.M., Kennedy J.L. Pharmacogenetics of psychotropic drug response // Am. J. Psychiatr. 2004. Vol. 161. № 5. P. 780-796.

Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA // Methods in molecular biology. Ed. J.M. Walker. NY: Haman press, 1984. Vol. 2. P. 31-34.

Mimics K., Middleton F., Marquez A. Molecular characterization of schizophrenia viewed by microarray analysis of gene expression in prefrontal cortex // Neuron. 2000. Vol. 28. P. 53-67.

Mössner R., Schuhmacher A., Wagner M., Quednow B.B. et al. DAOA/G72 predicts the progression of prodromal syndromes to first episode psychosis // Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci. 2010. Vol. 260. № 3. P. 209-215.

Need A.C., Ge D., Weale M.E., et al. A genome-wide investigation of SNPs and CNVs in schizophrenia // PLoS Genet. 2009. Vol. 5. № 2. P. e1000373.

Nicodemus K.K., Law A.J., Radulescu E., Luna A. et al. Biological validation of increased schizophrenia risk with NRG1, ERBB4, and AKT1 epistasis via functional neuroimaging in healthy controls // Arch. Gen. Psychiatry. 2010. Vol. 67. № 10. P. 991-1001.

O'Donavan M.C., Craddock N., Norton N. et al. Identification of loci associated with schizophrenia be genome-wide association and follow-up // Nat. Genet. 2008. Vol. 40. № 4. P. 1053-1055.

Ohtsuki T., Sakurai K., Dou H, Toru M. et al. Mutation analysis of the NMDAR2B (GRIN2B) gene in schizophrenia // Mol. Psychiatry. 2001. Vol. 6. № 2. P. 211-216.

Okahisa Y., Kodama M., Takaki M., Inada T. et al. Association between the Regulator of G-protein Signaling 9 Gene and Patients with Methamphetamine Use Disorder and Schizophrenia // Curr. Neuropharmacol. 2011. Vol. 9. № 1. P. 190-194.

Otnaess M.K., Djurovic S., Rimol L.M., Kulle B. et al. Evidence for a possible association of neurotrophin receptor (NTRK-3) gene polymorphisms with hippocampal function and schizophrenia // Neurobiol. Dis. 2009. Vol. 34. № 3. P. 518-524.

Owen M.J. Implications of genetic findings for understanding schizophrenia // Schizophr. Bull. 2012. Vol. 38. № 5. P. 904-907.

Pinsonneault J., Sadée W. Pharmacogenomics of multigenic diseases: sex-specific differences in disease and treatment outcome // AAPS Pharm. Sci. 2003. Vol. 5. № 4.

Prata D.P., Mechelli A., Picchioni M., Fu C.H. et al. No association of Disrupted-in-Schizophrenia-1 variation with prefrontal function in patients with schizophrenia and bipolar disorder // Genes Brain Behav. 2011. Vol. 10. № 3. P. 276-285.

Réthelyi J.M., Bakker S.C., Polgár P., Czobor P. et al. Association study of NRG1, DTNBP1, RGS4, G72/G30, and PIP5K2A with schizophrenia and symptom severity in a Hungarian sample // Am. J. Med. Genet. B: Neuropsychiatr. Genet. 2010. Vol. 153B. № 3. P. 792-801.

Riley B., Thiselton D., Maher B.S, Bigdeli T., et al. Replication of association between schizophrenia and ZNF804A in the Irish Case-Control Study of Schizophrenia sample // Mol. Psychiatry. 2010. Vol. 15. № 1. P. 29-37.

Ritchie M.D., Hahn L.W., Roodi N. et al. Multifactor-dimensionality reduction reveals high-order interactions among estrogen-metabolism genes in sporadic breast cancer // Am. J. Hum. Genet. 2001. Vol. 69. № 1. P. 138-147.

Saetre P., Agartz I., De Franciscis A., Lundmark P. et al. Association between a disrupted-in-schizophrenia 1 (DISC1) single nucleotide polymorphism and schizophrenia in a combined Scandinavian case-control sample // Schizophr. Res. 2008. Vol. 106. № 2-3. P. 237-241.

Schanze D., Ekici A.B., Gawlik M., Pfuhlmann B. et al. Evaluation of risk loci for schizophrenia derived from genome-wide association studies in a German population // Am. J. Med. Genet. B: Neuropsychiatr. Genet. 2011. Vol. 156. № 2. P. 198-203.

Schumacher J., Laje G., Abou Jamra R., Becker T. et al. The DISC1 locus and schizophrenia: evidence from an association study in a central European sample and from a meta-analysis across different European populations // Hum. Mol. Genet. 2009. Vol. 18. № 4. P. 2719-2727.

Shifman S., Johannesson M., Bronstein M., Sun C. et al. *Genome-wide association identifies a common variant* in the reelin gene that increases the risk of schizophrenia only in women // PLoS Genet. 2008. Vol. 4. № 2. P. e28.

Smeraldi E., Serretti A., Artoli P. et al. Serotonin transporter gene-linked polymorphic region: possible pharmacogenetical implications of rare variants // Psychiatr. Genet. 2006. Vol. 16. № 4. P. 153-158.

StatSoft, Inc. (2001). STATISTICA (data analysis software system), version 6. www.statsoft.com.

Stefansson H., Rujescu D., Cichon S. et al. Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia // Nature. 2008. Vol. 455. № 5. P. 232-236.

Stefansson H., Ophoff R.A., Steinberg S., Andreassen O.A. et al. Common variants conferring risk of schizophrenia // Nature. 2009. Vol. 460. № 6. P. 744-747.

Steinberg S., Mors O., Børglum A.D. et al. Expanding the range of ZNF804A variants conferring risk of psychosis // Mol. Psychiatry. 2011. Vol. 16. № 1. P. 59-66.

Tandon R., Keshavan M.S., Nasrallah H.A. Schizophrenia «Just the Facts»: what we know in 2008 part 1: overview // Schizophr. Res. 2008. Vol. 100. № 1-3. P. 4-19.

Van Winkel R., Esquivel G., Kenis G., et al. Genome-wide findings in schizophrenia and the role of gene-environment interplay // CNS Neurosci. Ther. 2010. Vol. 16. № 5. P. e185-192.

Yasuda Y., Hashimoto R., Ohi K., Fukumoto M. et al. Impact on schizotypal personality trait of a genome-wide supported psychosis variant of the ZNF804A gene // Neurosci. Lett. 2011. Vol. 495. № 3. P. 216-2120.

Zai C.C., Hwang R.W., De Luca V. Association study of tardive dyskinesia and twelve DRD2 polymorphisms in schizophrenia patients // Int. J. Neuropsychopharmacol. 2007. Vol. 10. № 5. P. 639-651.

Экстралингвистические характеристики речевого сигнала и показатели ЭЭГ у больных с различными аффективными расстройствами

Н.Н. Лебедева, Е.Д. Каримова, Е.А. Казимирова

Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) сравнивает депрессию с эпидемией, охватившей все человечество. На 51-й сессии ВОЗ было объявлено: депрессия уже вышла на первое место в мире среди причин неявки на работу, на второе – среди болезней, приводящих к потере трудоспособности. Если не будут приняты соответствующие меры, то к 2020 г. депрессия парализует экономическую жизнь как развитых, так и развивающихся стран. По прогнозам ВОЗ, к 2020 году депрессия выйдет на первое место в мире среди всех заболеваний, обогнав сегодняшних лидеров – инфекционные и сердечно-сосудистые заболевания (Murray, Lorez, 1996). Уже сегодня она является самым распространенным заболеванием, которым страдают женщины. Депрессии, являясь одной из наиболее широко распространенных форм эмоциональных расстройств, влияют на многие сферы жизни человека, меняют восприятие и оценку поступающей информации, нарушают адекватность реагирования, снижают работоспособность (Кербиков, 1971; Авербух, 1962).

Первый этап лечения депрессий – это грамотная диагностика, однако эта проблема является далеко не решенной. По результатам проведенных исследований было выявлено, что доля больных, которым устанавливается правильный диагноз, не превышает 10–55% (Derogatis, 1989). По сей день основным методом диагностики депрессий является собеседование психотерапевта-консультанта и клиента. В ряде случаев с целью диагностики состояния специалист прибегает к использованию психологических тестовых методик и лишь изредка – к помощи электрофизиологических методов. Крайне важным аспектом в плане выбора стратегии лечения является определение причины и вида депрессии, ее уровня тяжести, а также характера депрессивного расстройства. Кроме того, в последние годы в диагностических целях начали использовать компьютерную и магнитно-резонансную томографию (КТ, МРТ). Очевидно, что метод собеседования является достаточно субъективным, зависит от квалификации и личности врача и не обеспечивает корректную постановку диагноза; исследования с использованием ЭЭГ зачастую демонстрируют противоречивые результаты, что связано, по-видимому, с множеством различных видов депрессий; методы КТ и МРТ дают достаточно высокую точность диагностики, но весьма дороги и не всегда доступны для пациентов.

В связи с этим представляется актуальной задачей создание объективного неинвазивного недорогого физиологического метода дифференциальной диагностики депрессии (вида, тяжести и пр.).

Сокращения: ВОЗ – всемирная организация здравоохранения; КТ – компьютерная томография; магнитно-резонансная томография; МДП – маниакально-депрессивный психоз.

Депрессия трактуется как патологически сниженное настроение с переживанием тоски и печали и характеризуется двигательной и мыслительной заторможенностью. То, что именно депрессия не имеет четкой классификации и определения, отмечают многие авторы (Ветроградова, 1986; Baro, 1978; Owren et al., 2005; Pull et al., 1977). В нейрофизиологических исследованиях было показано, что в состоянии депрессии преобладает тормозное влияние гиппокампа, блокирующее в период глубокой депрессии активирующие механизмы мозга, тем самым снижая уровень бодрствования (Бехтерева, 1966; Виноградова, 1975; Гриндель, 1974).

Попытка выявить патофизиологические механизмы маниакально-депрессивного психоза (МДП) до сих пор не привела исследователей к единому мнению. Большое значение в развитии аффективных психозов придается генетическим факторам. Нет единого мнения и в вопросе о соотношении структурных и функциональных изменений в патологических процессах нервной системы (Саркисов и др., 1988). Одни авторы считают, что структурные изменения являются результатом длительных функциональных изменений, другие – что именно структурные изменения влияют на функциональные.

Несмотря на разногласия в этом вопросе, исследования дали основания полагать, что в патогенезе МДП основную роль играют нарушения синаптической передачи в системе нейронов гипоталамуса и других базальных отделов мозга. Эти отделы, в свою очередь, участвуют в формировании таких психических реакций, как бодрствование, настроение, аффекты (Зайдель и др., 1988).

При исследовании ЭЭГ депрессивных больных многие авторы показали качественные и количественные особенности, отличные от ЭЭГ-характеристик здоровых людей и больных с иной нозологией (Монахов и др., 1983; Morozov, 1996). Так, у лиц с эндогенной депрессией обнаружено снижение частоты α-ритма в левом полушарии и увеличение его амплитуды при высоком уровне депрессии; при низком уровне депрессии увеличение амплитуды α-волн регистрировали в правом полушарии. Некоторые авторы отмечают увеличение мощности альфа-активности в лобных отделах коры больших полушарий головного мозга при углублении депрессии (Vacca et al., 1980).

При исследовании различных вариантов депрессии Е.С. Михайлова (1980) использовала такие вегетативные показатели, как частота сердечных сокращений и кожно-гальваническая реакция. Автором было показано, что в условиях эмоционального напряжения с ожиданием болевого воздействия у большинства депрессивных больных наблюдалось урежение сердечного ритма, в то время как у здоровых испытуемых аналогичная ситуация вызывала его учащение. При анализе кожно-гальванической реакции у больных наблюдалась более значительная ее вариабельность по сравнению со здоровыми испытуемыми.

Также Е.С. Михайловой были установлены особенности спектрального состава ЭЭГ для разных типов депрессии, различные реакции на афферентные воздействия. У всех больных депрессивными расстройствами наблюдалось повышение мощности ритмов в θ-диапазоне по сравнению со здоровыми людьми и доминирование в спектре мощности α-1- или α-2-диапазонов в зависимости от типа депрессий. При афферентных воздействиях наблюдалось два типа перестроек структуры

ЭЭГ: активный – в виде депрессии α-ритма и усиления α-активности, и тормозный – сопровождавшийся экзальтацией α-ритма и снижением θ-активности (Михайлова, 1980).

Все исследователи больных аффективными расстройствами сходятся в том, что при депрессиях повышается активность правого полушария. В.Б. Стрелец наблюдала устойчивый фокус повышенной β-2-активности в правой лобной области, указывающий на гиперактивацию зоны, участвующей в регуляции отрицательных эмоций. Кроме того, в этой работе указывается на то, что больных с депрессией отличает общее снижение суммарной мощности ЭЭГ, за исключением θ-ритма, что не вполне совпадает с результатами других исследователей (Стрелец и др., 1997).

Ю.В. Орехов проводил исследования депрессивных больных с регистрацией ЭЭГ при эмоциональных нагрузках. Было показано, что у больных депрессиями преобладает высокочастотная составляющая ЭЭГ (β-2-диапазон), наблюдается фокус повышенной γ-активности в правой лобной области, который исчезает при переживании различных эмоциональных состояний, то есть эмоциональная нагрузка вне зависимости от знака эмоции снижала различия распределения биоэлектрической активности между больными и здоровыми испытуемыми (Орехов и др., 2004).

Исследования группы больных эндогенной депрессией до и после фармакотерапии напротив, выявили достоверное увеличение относительных мощностей δ- и θ-активности и снижение мощности высокочастного диапазона ЭЭГ, уменьшение региональных различий между передними и задними отделами мозга у больных по сравнению со здоровой группой испытуемых. Кроме того, наблюдалось также повышение активности правого полушария. После курса лечения нарушения биоэлектрической активности коры все еще сохранялись, однако мощности медленных ритмов снижались, а α-активность увеличивалась (Омельченко, Заика, 2002).

Пространственно-временная организация биопотенциалов коры больших полушарий, безусловно, отражает клиническую картину невротической депрессии. Так, в группе пациентов с депрессивным синдромом без сопутствующих проявлений максимальные изменения наблюдаются в задневисочной области обоих полушарий; у пациентов с тревожно-депрессивными расстройствами обнаружено снижение кросскорреляционных и когерентных связей в лобно-височных областях обоих полушарий и ярко выраженное повышение кросскорреляционных отношений в правой задневисочной области; в группе пациентов с выраженными астеническими проявлениями выявлено снижение кросскорреляционных и когерентных связей в лобно-височных областях обоих полушарий (Ивонин и др., 2012).

А.Ф. Изнак и соавторы также указывают на отличительные особенности биоэлектрической активности коры при различных видах аффективных расстройств. Оказалось, что у пациентов с преобладанием депрессивных расстройств наблюдались повышенные значения мощности быстрых – α- и β-ритмов, тенденция к ускорению доминантной частоты α-ритма и ее локализация в затылочных областях левого полушария. У больных с преобладанием истерических расстройств затылочный α-ритм практически отсутствовал, но наблюдалась α-активность в сенсомоторных областях. Пациенты с преобладанием тревожных расстройств демонстрировали гиперсинхронный тип ЭЭГ с повышенными значениями мощности за-

медленного α-ритма, а также θ- и δ-активности и наличием высокоамплитудных полиморфных вспышек заостренных θ- и δ-волн (Изнак, Никишова, 2007).

Кроме того, А.Ф. Изнак приводит данные по соотношению степени тяжести депрессии с признаками ЭЭГ. Так, исходная степень тяжести ассоциировалась с ЭЭГ-признаками сниженного функционального состояния передних отделов левого полушария и повышенной активацией правого полушария; улучшение клинического состояния сопровождалось уменьшением пиковой латентности «поздних» компонентов (P2, N2 и P3) когнитивных слуховых вызванных потенциалов и усилением тормозных процессов в правом полушарии (Изнак и др., 2011). Более того, А.Ф. Изнак указывает, что предикторами степени ремиссии пациентов являются значения мощности β1- и β2-ритмов, при этом исходно бóльшие значения спектральной мощности β-активности ассоциируются с большей выраженностью остаточных симптомов депрессии после курса терапии (Изнак и др., 2013).

Электроэнцефалография является самым распространенным инструментальным методом исследования и диагностики аффективных расстройств, однако, немотря на то что применение ЭЭГ началось уже достаточно давно, до сих пор не существует четкого единого мнения исследователей по структуре и динамике картины биоэлектрических потенциалов при депрессивных заболеваниях. Возможно, применение метода регистрации биопотенциалов совместно с другими инструментальными подходами могло бы дать более ясные результаты.

Методы диагностики состояний человека с помощью анализа его речи учитывают интегрирующую роль речевой функции в регуляции уровней активации коры (Лурия, 1973). Особенно это важно в психодиагностике. Здесь особое внимание уделяется мыслительным процессам (идеаторный компонент), лексико-грамматическим характеристикам речи больного (Ветроградова и др., 1980; Галагудзе, 1980).

Речь является высшей психической функцией мозга человека и содержит не только вербальную информацию, связанную со смыслом произнесенной информации, но и несет в себе огромное количество невербальной, экстралингвистической информации, такой как пол, возраст говорящего; по речи человека мы можем понять его эмоциональное и психологическое состояние, состояние здоровья. Кроме того, возникающие изменения далеко не всегда можно сознательно контролировать.

Даже из обыденного опыта известно, что экстралингвистические компоненты звуковой речи могут указать на состояние говорящего вне зависимости от семантической стороны сообщения. Известно, что, опираясь на невербальный компонент, слушатель иногда вносит существенные коррекции в смысл данного сообщения. Особенно ярко это проявляется в ситуации рассогласования вербального и невербального поведения в процессе общения. В этом случае, как правило, в большей степени оказывается доверие последнему (Frijda, 1969).

Опыт исследований в области проблем распознавания семантической и просодической составляющих речи показал, что идеальным аппаратом их решения является система восприятия речевой информации человека, которая включает в себя ухо, обеспечивающее получение признаков речевого сигнала, и слуховой центр головного мозга, который непосредственно решает задачу ее распознавания. При

этом система слухового восприятия человека с легкостью распознает не только семантическую информацию вне зависимости от того, кто ее сообщает, но и улавливает тончайшие оттенки эмоционального состояния (т.е. характеристики голоса диктора), обеспечивает адаптацию к помеховым условиям и изменениям темпа речи, ее высоты и др. параметров.

Можно перечислить некоторые основные акустические средства, с помощью которых осуществляется передача просодической составляющей речевого сигнала: а) тембр голоса, физическим эквивалентом которого является спектр звука, т.е. графическое отображение частотного (обертонового) состава голоса, б) мелодика речи (изменение высоты голоса во времени), в) энергетические характеристики (сила голоса и ее изменение), г) темпо-ритмические особенности речи, д) атипичные индивидуальные особенности произношения (смех, покашливание, заикание и т.п.) (Морозов, 1988а).

Выбор тех или иных анализируемых параметров речевого сигнала (РС) зависит от поставленных целей. Невербальная информация характеризуется спектром речевого звука, а именно – динамикой форматной структуры спектра во времени (Фант, 1964). При этом для речи высота голоса, т.е. частота основного тона, практически не имеет значения, поскольку любую речевую информацию можно передать голосом любой частоты в пределах звуковысотного диапазона говорящего. Носителем невербальной информации наряду со спектром являются и звуковысотные характеристики голоса (мелодика речи, т.е. динамика частоты основного тона) (Морозов, 1988б).

Показателями эмоционального состояния человека служат такие лексико-грамматические параметры, как характер построения ответа, лексическое разнообразие, наличие междометий, слов-паразитов и др. Акустические характеристики речевого сигнала, которые используют в задаче распознавания эмоционального состояния человека, можно разделить на три группы – это спектральные признаки, темпоральные характеристики и нелинейные показатели.

К первой группе спектральных признаков речевого сигнала относится самое большое количество параметров, так как современный математический аппарат и программное обеспечение позволяют выявлять самые различные характеристики из спектра акустического сигнала. Это такие величины, как средняя частота основного тона и ее дисперсия, форма интонационных кривых гласных речи, средняя мощность и дисперсия мощности речевого сигнала, частоты, амплитуды и ширина формант гласных, джиттер, шиммер, кепстральные характеристики и др. (Сидоров, Филатова, 2012; Bachorowski, Owren, 2002; Petri, 2004).

Для оценки состояния человека обычно используют следующие темпоральные характеристики: среднюю длительность чистой речи и пауз, комбинацию пауз и речи, скорость артикуляции, латентный период речевой реакции, однако обычно при исследовании функционального состояния данные параметры используют в сочетании со спектральными характеристиками (Дмитриева и др., 2004, 2009; Дмитриева, Гельман, 2011; Фролов и др., 2004; Forsell, 2007).

Методы нелинейной динамики в исследовании ФС, или эмоционального состояния человека, начали использовать гораздо позднее спектрального и темпорального анализа, при этом уже существует большое количество подходов и, соответствен-

но, параметров, используемых при анализе речевого сигнала: показатель Ляпунова, энтропия Колмогорова, размерности вложенного аттрактора, глобальная корреляциионная размерность D_2, размерность Хаусдорфа, коэффициент фрактальности и т.д. При этом исследователи используют данные показатели нелинейной динамики как для самого речевого сигнала (Сидоров, Филатова, 2012), так и для последовательности длительностей голосовых сегментов в речи (V-ритма) (Скляров, 2004).

Так, при исследовании фрактальной размерности флуктуаций основного периода речи (вариации длительности пауз речи) было установлено, что речевой сигнал человека обладает хаотическим аттрактором с фрактальной размерностью 2,5–3. При этом искусственная речь, синтезированная компьютером и не обладающая фрактальной структурой, воспринимается на слух труднее естественной, причем использование фрактальной модуляции устраняет этот недостаток компьютерной речи (Satoh, 1991). Фрактальной размерностью можно характеризовать и силу звука при разговоре. Фрактальные флуктуации наряду с фрактальными аттракторами зарегистрированы в речевом сигнале человека (Kniffki, 1993; Mandelbrot, 1977). Р. Босс и Дж. Кларк, изучая *1/f-шум* в музыке и речи, сделал вывод, что это явление может играть существенную роль в креативном (творческом) процессе (Voss, Clarce, 1975).

С помощью методов нелинейной динамики было показано, что в речевом сигнале заключена информация о состоянии вегетативной нервной системы: у парасимпатотоников корреляционная размерность D2 речевого сигнала была самой высокой, у симпатотоников – самой низкой, у нормотоников показатель D2 был средним. Кроме того, у женщин корреляционная размерность голосового сигнала была достоверно выше, чем у мужчин (Лебедева и др., 2013).

Таким образом, поиск количественных оценок, являющихся коррелятами эмоциональной окраски экстралингвистической составляющей речи, является весьма актуальной задачей.

При изучении эмоциональной выразительности речи, которая достигается за счет сложного взаимодействия лексических, грамматических и акустических средств, среди лексико-грамматических изменений в случае развития тревожных состояний наблюдается примитивизация речи, нарушение синтаксической стройности высказывания, появление большого количества нерелевантных отдельных слогов, слов, словосочетаний (Носенко, 1975; Mahl, 1963). Напротив, для эйфории характерно частое использование восклицаний, превосходных степеней и литераций, насыщенность шутками и юмором (Никонов, 1985). Практика общения показывает, что человеческий слух способен различать эмоциональные состояния говорящего и при отсутствии каких-либо указаний на этот счет со стороны семантики.

Субъективно изменения акусто-фонетических признаков воспринимаются как изменение громкости, тембра, интонационного оформления высказывания, темпа речи. Исследования спектральных характеристик для ряда стенических эмоций выявили, что с увеличением силы эмоции спектр речевого сигнала смещается в сторону высоких частот, концентрируясь в своей высокочастотной области при положительных эмоциях и в низкочастотной – при отрицательных. При этом значения формантных частот и ширина полосы формантных зон увеличиваются для сильных эмоций на 100–200% (Лукьянов, Фролов, 1969; Никонов, 1985).

Одним из средств передачи информации о состоянии говорящего является также речевая интонация. Интонация субъективно воспринимается как изменение высоты и интенсивности голоса, объективно же – с помощью технических средств – как изменение частоты основного тона и амплитуды речевого сигнала. Увеличение стеничности эмоций ведет к повышению частоты основного тона (Витт, 1965; Таубкин, 1978). Развитие депрессивных состояний, напротив, приводит к уменьшению этого показателя ниже уровня, соответствующего норме (Бажин и др., 1975; Moses, 1960). Значительные изменения претерпевает и форма мелодической кривой. Нейтральное состояние характеризуется, как правило, незначительным диапазоном изменения частоты основного тона, плавным переходом от подъемов к спадам, отсутствием выбросов среди мгновенных значений частоты основного тона. Рост эмоциональной напряженности стенического плана приводит обычно к значительному увеличению дисперсии основного тона, появлению диссонансов (выбросов) на мелодической кривой. Характер мелодических подъемов и спадов становится более выраженным. Для астенических эмоций характерны: уменьшение по сравнению с нейтральным состоянием дисперсии мелодической кривой, плавность переходов от подъемов к спадам, интонационная невыразительность (Бажин и др., 1975; Никонов, 1985; Moses, 1960). Использование формы мелодической кривой главноударных гласных звуков речи положено в основу метода автоматического распознавания эмоций по голосу в работах М.В. Фролова и др. (2005).

Эмоции стенического плана вызывают увеличение уровня громкости речи, резкие перепады уровня со значительными всплесками интенсивности, соответствующими выделенным словам. Астенические эмоции характеризуются уменьшением среднего уровня громкости речи и отсутствием диссонансов.

Значительные изменения у больных и у здоровых людей в эмоциональном состоянии претерпевает и темп речи. В работе нашей лаборатории (Ераценко, Вельтищев, 1991) было показано, что у больных с ведущим аффектом тоски средняя длительность чистой речи меньше, чем у здоровых испытуемых, а средняя длительность пауз – больше. При ведущем аффекте тревоги на уровне патологического состояния средняя длительность чистой речи имела высокие показатели, а средняя длительность пауз – низкие. В процессе лечения все параметры речи приближались к норме.

Дальнейшие исследования позволили подойти к решению проблемы выявления нозологических особенностей (эндогенная и психогенная депрессии) у больных с ведущим аффектом тревоги. Пациенты с психогенной депрессией демонстрировали короткую длительность пауз на фоне увеличенной длительности чистой речи, что отражает моторное и идеаторное возбуждение. Напротив, у пациентов с эндогенной депрессией увеличение длительности чистой речи сопровождалось ростом длительности пауз, что характеризует идеаторное торможение на фоне моторного возбуждения. Указанные особенности темпа речи соответствовали клинической картине данных групп заболеваний (Фролов и др., 1994).

При исследовании больных с маниакально-депрессивным психозом (Hutt, Coxon, 1965; Lorens, Cobb, 1952; Nilsonne, 1987; Ostwald, 1963; Stussen, Bomben, 1988) было отмечено, что речь здорового человека отличается от речи маниакального больного

распределением частей речи и количеством слов, произносимых за одну минуту, а изменения громкости наиболее точно предсказывают клинические улучшения. У больных в состоянии мании увеличивалась длина спонтанных предложений. Было отмечено, что у больных с биполярным расстройством с повторяющейся цикличностью перед переключением в манию речь была значительно быстрее и замедлялась перед переключением в депрессию (Stoddard, 1977). Что касается лексического и синтаксического содержания речи больных с МДП, то исследователи (Andreasen, Pfohl, 1976) при анализе этих характеристик не нашли значительных отклонений. Однако было отмечено, что маниакальные больные использовали более яркие слова при описании действий, а депрессивные больные говорили неясно, с оговорками.

Таким образом, несмотря на то что в психиатрической литературе есть указания на значительные изменения речи у больных МДП, в исследованиях не применялась ни одна из количественных методик, все имеющиеся данные носят скорее качественный характер – все попытки анализировать речь депрессивно-маниакальных больных сводятся в основном к описанию характера речи («Говорит тихо», «Речь замедленна, говорит с большими паузами» и т.п.). Некоторые исследователи (Hutt, Coxon, 1965) пытались оценить состояние больных с помощью характеристик темпа речи, однако они дают сравнительный анализ только крайних состояний «норма–депрессия», «норма–мания», «мания–депрессия».

Можно заключить, что в отечественной медицине количественный речевой анализ практически не используется, в то время как зарубежная литература свидетельствует о применении речевого анализа в диагностике депрессивных расстройств.

Группа исследователей из Женевы в своей работе провели сравнительный анализ изменений параметров речевого сигнала при различных психических нарушениях. Было показано, что частота основного тона повышается при таких заболеваниях, как эйфория, мания, тревожность и синдром беспомощности. Частота первой форманты понижается при мании и эйфории и повышается при тревожности и беспомощности. Интенсивность речи, так же как и скорость произношения, повышается при эйфории, мании и беспомощности и уменьшается при тревожности (Scherer, Johnstone, 2003).

В работе (Rothkrantz et al., 2004) использовались различные акустические характеристики речевого сигнала для определения состояния стресса у дикторов, при этом с каждым испытуемым проводили стресс-тест Струпа. При повышении степени напряжения дикторов увеличивалась вариабельность частоты первой форманты, понизились энергия высокочастотной области спектра и джиттер, при этом частота основного тона и длительность фраз практически не изменились.

Возможность автоматического распознавания и классификации различных психических расстройств исследовалась в работе (Cummins et al., 2011). Использование различных спектральных показателей показало, что наиболее информативными являются первые две форманты и кепстральные коэффициенты тональной частоты (MFCC – Mel-frequency Cepstral Coefficients). Частота первой форманты F1 у больных депрессивными расстройствами имеет бо́льшее стандартное отклонение, чем у группы здоровых испытуемых, а коэффициент тональной частоты у пациентов достоверно выше.

Акустические маркеры депрессии и эффективности ее терапии оценивались в работе (Mundt et al., 2012). Больных с глубокой депрессией исследовали до и после лечения. У пациентов в начале терапии темп речи был значительно медленнее, чем у здоровых испытуемых, а количество пауз – больше. Больные с позитивной динамикой лечения демонстрировали более значительные изменения в речи. Частота основного тона и частота первой форманты повышались у больных, на которых лечение хорошо подействовало, и уменьшались у больных без значимой положительной динамики состояния.

В последние годы в связи с возможностями программирования становится популярным следующий подход в анализе речевого сигнала: вычисляются всевозможные спектральные и кепстральные показатели речевого сигнала, а затем данный многомерный вектор, характеризующий речь одного из пациентов, различными математическими методами сравнивают с другими пулами акустических показателей других больных или здоровых испытуемых (Williamson et al., 2013). Например, в работе (Sanchez et al., 2011) авторы статьи также регистрировали речь больных глубокой депрессией: полученный массив спектральных показателей, таких как мощность спектра, часто́ты основного тона и формант, анализировали с помощью программы-классификатора.

Очевидно, что речь больных депрессией отличается от речи здоровых людей, т.е. акустический сигнал содержит в себе информацию о наличии и степени тяжести психического заболевания. Кроме того, литературные данные по данной проблеме указывают на то, что распознавание различных типов депрессивных заболеваний по речевому сигналу принципиально возможно. Практическая значимость подобных исследований не вызывает сомнений, поскольку использование методики анализа речи в качестве основного или дополнительного инструментального подхода при диагностике различных аффективных расстройств может в разы повысить точность постановки диагноза и, соответственно, эффективность терапии.

В исследовании принимали участие 12 здоровых испытуемых, которые составили контрольную группу, а также 33 больных с различными видами аффективных расстройств, которые были объединены в 4 основные группы – депрессивные расстройства, смешанные тревожные и депрессивные расстройства, ипохондрические расстройства и панические расстройства. Во время исследования последовательно выполнялись следующие задания:

• *тестирование на функциональную асимметрию;*

• *запись речи во время прочтения вслух шести вопросов;*

• *запись ЭЭГ с функциональными пробами с помощью энцефалографа-анализатора ЭЭГА-21/26 «ЭНЦЕФАЛАН 131-03», г. Таганрог.*

На любом этапе эксперимента участник исследования имел право прервать исследование в случае усталости или дискомфорта. Методики, используемые в экспериментах, и схема проведения опытов были одобрены Этическим комитетом Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН.

Речевой сигнал. Для создания массива речевых данных участников исследования просили прочесть вслух 9 вопросов и ответить на них. Обработке подвергалась речь при произнесении вопросов, а не спонтанная речь в ответах. Речевой

сигнал записывался на портативный цифровой USB-рекордер GEMINI IKEY PLUS – iKEY, в формате WAV, с частотой дискретизации 44,1 кГц. Полученные файлы с помощью авторского программного обеспечения конвертировались из формата wav в txt, далее производились вычисления корреляционной размерности D_2. Данная нелинейная характеристика передает сложность временного сигнала, степень его хаотичности. В наших предыдущих работах было показано, что корреляционная размерность D2 отражает такие физические характеристики произнесенного звука, как частота основного тона (высота звука) и формантная структура спектра звукового сигнала, то есть является характеристикой тембра голоса (Лебедева и др., 2013). Поскольку эмоциональная составляющая речи проявляется в изменении тембральных характеристик голоса диктора, это отражается и на глобальной корреляционной размерности D2.

Электроэнцефалографическое исследование. Запись ЭЭГ осуществлялась с помощью энцефалографа-анализатора ЭЭГА-21/26 «ЭНЦЕФАЛАН 131-03», г. Таганрог (19 электродов по системе 10–20 монополярно относительно ушных электродов A1 и A2). Для всех отведений задавали частоту опроса 250 Гц, полосы фильтрации 0,5–60 Гц (12 дБ/октаву), импеданс менее 10 кОм. Для каждого участника исследования были получены записи ЭЭГ в состоянии покоя с закрытыми глазами, которые обрабатывались методом спектрально-корреляционного анализа на основе быстрого преобразования Фурье (БПФ). Для спектрального анализа сигнала ЭЭГ выбирались фрагменты длительностью около 15 секунд, не содержащие артефакты, с помощью программы «ЭНЦЕФАЛАН 131-03» рассчитывались относительные мощности сигнала, затем полученные значения усреднялись.

Для анализа пространственного распределения мощностей ритмов ЭЭГ вычислялись коэффициенты, равные отношению мощностей в париетальных отведениях к мощностям во фронтальных отведениях P = (P3A1+P4A2)/(F3A1+F4A2) для каждой полосы частот.

Для статистической обработки всех полученных результатов использовалась программное обеспечение Word Excel и Statistica v. 8.0.

Анализ речевого сигнала выявил отличия показателя нелинейной составляющей D2 больных от контрольной группы, а также особенности его динамики в процессе лечения и в зависимости от диагноза.

На рис. 1 представлено распределение значений индивидуального стандартного отклонения D2 речевого сигнала среди участников обследования контрольной группы и группы больных. Стандартное отклонение рассчитывалось для каждого участника по значениям D2 прочитанных вопросов.

По приведенным выше графикам стандартного отклонения видно, что у больных распределение значений стандартного отклонения стремится к нормальному и имеет выраженный пик в интервале 0,04–0,05. Это является свидетельством того, что эта группа, в отличие от контрольной, имеет относительно одинаковую вариабельность нелинейной характеристики речевого сигнала, то есть межиндивидуальные различия больных аффективными расстройствами выражены значительно слабее, чем у здоровых людей.

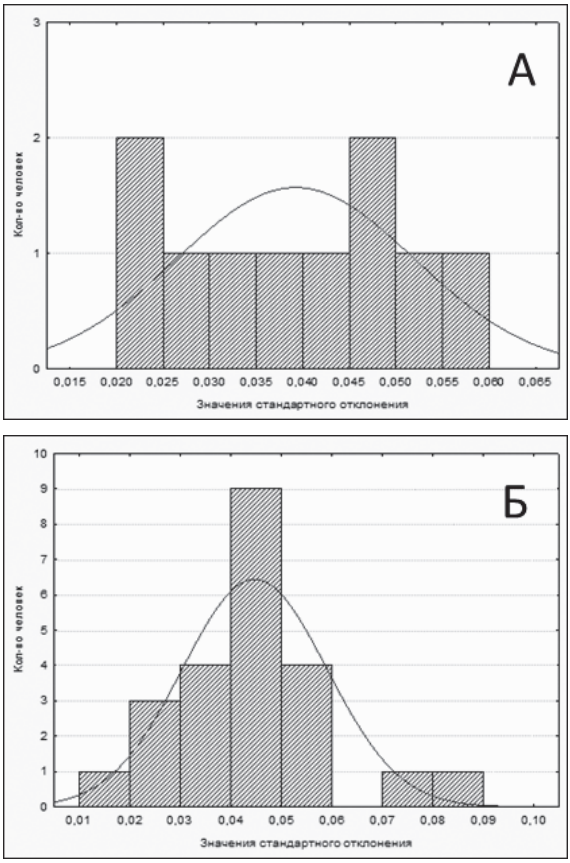


Рис. 1. Распределение значений индивидуального стандартного отклонения D2 речевого сигнала среди испытуемых двух групп – контрольной (А) и группы пациентов (Б)

По оси x – значения стандартного отклонения, по оси y – количество испытуемых, для которых стандартное отклонение попадает в данный интервал

Анализ осуществлялся отдельно для каждой группы с одинаковым диагнозом. На рис. 2 представлено пять скаттерограмм, где координаты (x, y) каждой точки – значения D2 для двух последовательно зачитанных вопросов для одного человека.

Как видно из рисунка, в контрольной группе сильнее проявляются межиндивидуальные различия, и скаттерограмма имеет вытянутую форму. На скатерограммах больных точки лежат более плотно, т.е. вариабельность речи пациентов значительно меньше, чем у здоровых, болезнь нивелирует индивидуальные различия, хотя в случае смешанного расстройства такая тенденция не так заметна. Этот результат коррелирует с приведенными выше данными по распределению значений стандартного отклонения среди больных, согласно которому межиндивидуальные различия больных выражены слабее.

Кроме того, была проанализирована нелинейная характеристика речевого сигнала каждого больного до и после лечения. На рис. 3 представлены скаттерограммы групп пациентов с разными диагнозами до и после терапии.

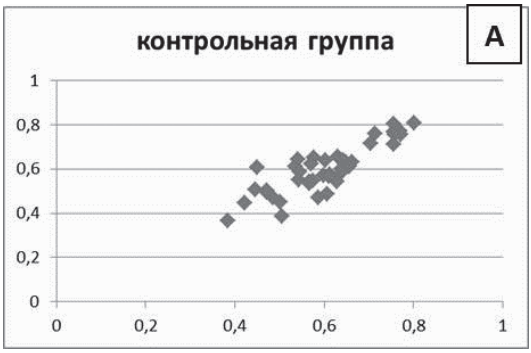
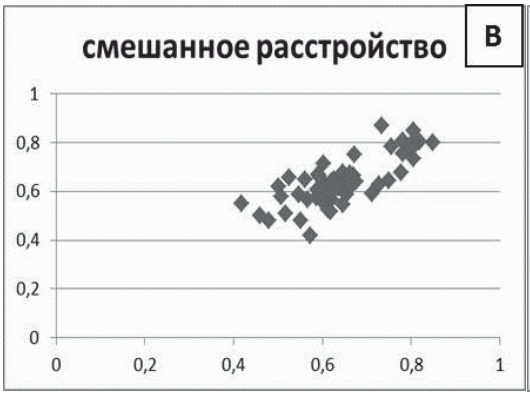
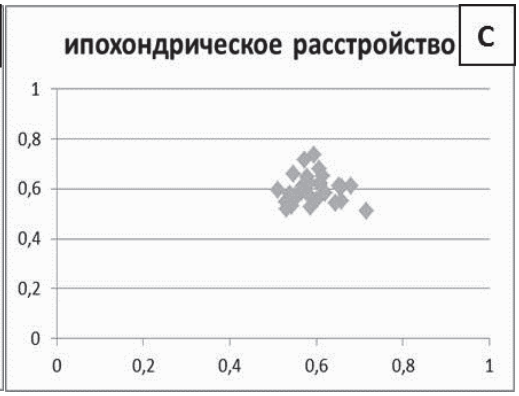
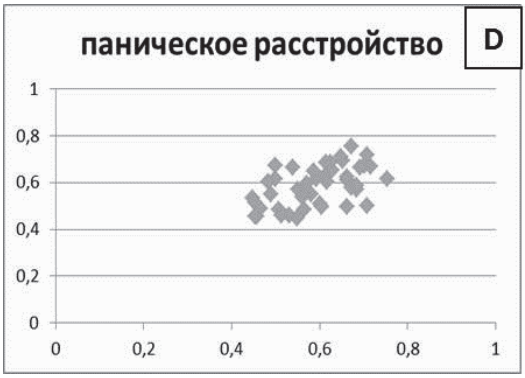
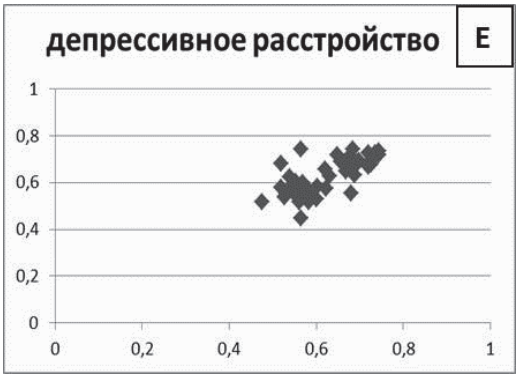


Рис. 2. Скаттерограммы для: A – контрольной группы; пациентов с разными диагнозами – B – смешанное тревожное и депрессивное, C – ипохондрическое расстройство, D – паническое расстройство, E – депрессивное расстройство









Изменения речевого сигнала после лечения зависят от диагноза больных. У некоторых больных происходит уменьшение значений корреляционной размерности (как при депрессивном (A) и смешанном (D) расстройствах), увеличение гармонической составляющей речи. На слух такое изменение воспринимается как увеличение мелодичности голоса. У других пациентов появляется больше обертонов. Эти изменения отражаются в увеличении значений D2 (как при паническом расстройстве, B). Это согласуется с данными, представленными выше, согласно которым меж-

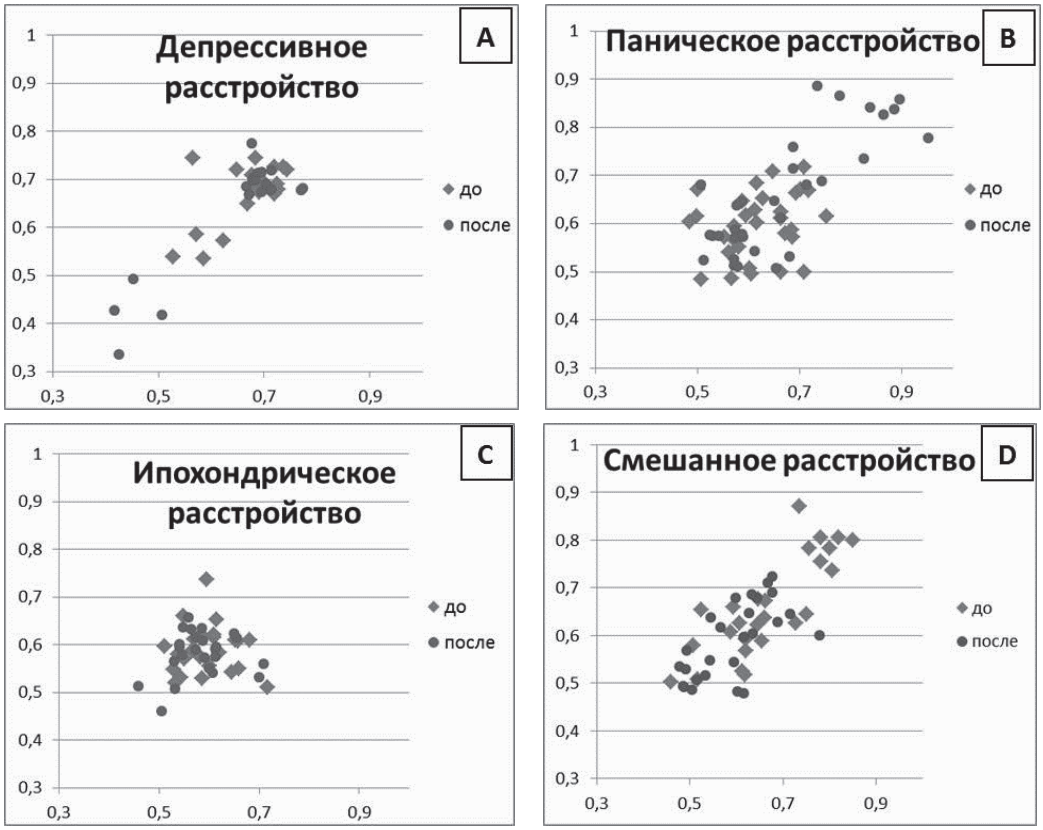


Рис. 3. Скаттерограммы значений D2 пациентов с различными диагнозами до и после лечения
A – депрессивные расстройства; B – паническое расстройство; C – ипохондрическое расстройство; D – смешанное тревожное и депрессивное расстройство

индивидуальная изменчивость в группе людей с психическими расстройствами снижена, а после лечения она восстанавливается. Голосовой сигнал для разных людей может очень сильно различаться – у одних голос плавный, у других, напротив, более выражены шумовые компоненты. Совокупность различных голосовых характеристик определяет специфическую окраску голоса (тембр речи), интегральной характеристикой которого является корреляционная размерность D2. Разнонаправленные изменения этой величины после лечения объясняются различием самого понятия «нормы» этой характеристики для каждого конкретного человека.

Следует отметить, что если некоторые аффективные расстройства «усредняют» всех больных, и в процессе лечения изменения, в частности речевого сигнала, происходят разнонаправленно, как при паническом расстройстве, то пациенты с другим диагнозом показывают однонаправленные изменения, как при депрессивных расстройствах.

Таким образом, уточнение влияния каждого вида аффективных расстройств на речевой сигнал и механизмов этого влияния требует дальнейших исследований на большей выборке пациентов.

Регистрация электроэнцефалограммы (ЭЭГ) производилась во время функциональных проб в состоянии покоя с закрытыми и открытыми глазами. Анализ относительных мощностей ритмов ЭЭГ по 19 каналам показал, что у пациентов с паническим и депрессивными расстройствами относительная мощность α-ритма при закрытых глазах достоверно (по критерию Дункана, $p<0,05$) ниже, чем у здоровых испытуемых и пациентов с другими типами расстройств. При этом больные с паническими расстройствами демонстрируют повышенную мощность δ- и β-ритмов, а пациенты с депрессивными расстройствами – повышенную θ-активность.

После лечения наблюдается достоверное (по критерию Дункана, $p<0,05$) увеличение мощности θ-ритма практически у всех больных. Альфа-активность снижается у всех групп пациентов кроме больных депрессивными расстройствами.

Анализ относительных мощностей ЭЭГ-ритмов при открытых глазах показал еще большую неоднородность среди различных групп пациентов. У больных ипохондрическим расстройством в состоянии покоя с открытыми глазами наблюдается доминирование медленноволновой активности (δ- и θ-ритмов), у больных смешанным тревожно-депрессивным расстройством – гиперсинхронный α-ритм в сенсомоторных областях, пациенты с паническим расстройством демонстрируют повышенную δ- и β-активность (как и в состоянии с закрытыми глазами), а у испытуемых с депрессивными расстройствами можно наблюдать преобладание более низкочастотной (порой снижающейся до θ-диапазона) α-активности в центральных областях.

После лечения также наблюдаются изменения ритмической структуры ЭЭГ больных по сравнению со здоровой группой испытуемых, свидетельствующие о неблагоприятном функциональном состоянии коры больших полушарий. Однако можно видеть и положительную динамику – у пациентов со смешанным тревожно-депрессивным расстройством снизилась доля сенсомоторного α-ритма, у больных депрессивными расстройствами повысилась частота и мощность α-активности и при этом уменьшилась доля θ-ритма.

Значение доминантной частоты α-ритма у больных паническим и депрессивными расстройствами достоверно ниже, чем у здоровых, пик α-активности сдвигается в сторону θ-диапазона. Частота пика θ-ритма у пациентов с ипохондрическим и смешанным тревожным и депрессивным расстройствами достоверно ниже (по критерию Дункана, $p<0,05$), чем у здоровых испытуемых. Кроме того, спектр мощности α-ритма у больных зачастую характеризуется наличием двух или трех выраженных пиков, тогда как у контрольной группы в спектре преобладает один пик α-активности.

У контрольной группы испытуемых α-активность локализована в париетально-окципитальных областях, тогда как у больных α-активность доминирует в центральных областях и имеет более диффузный характер. Распределение α-активности у пациентов значительно отличается от распределения в контрольной группе. При этом после лечения у пациентов с ипохондрическим расстройством α-активность перераспределяется ближе к затылочным областям, а у больных паническим расстройством, наоборот, α-активность доминирует в центральных областях.

* * *

По результатам анализа речевого сигнала и биоэлектрической активности коры можно отметить, что наименьшие изменения относительно контрольной группы наблюдались в группе смешанных тревожных и депрессивных расстройств: распределение D2 речевого сигнала было аналогичным контрольной группе, в состоянии спокойного бодрствования с закрытыми глазами изменения касались только неправильного пространственного распределения α-активности.

Изменения D2 речевого сигнала при ипохондрическом расстройстве характеризовались значительным снижением вариабельности, электроэнцефалограмма покоя с открытыми глазами характеризовалась повышенной мощностью δ-ритма и сниженной частотой θ-активности. После терапии изменения D2 речевого сигнала не наблюдалось.

У пациентов с депрессивными расстройствами распределение D2 речевого сигнала характеризовалось сниженной вариабельностью. В ЭЭГ в состоянии покоя по сравнению со здоровыми испытуемыми наблюдалось повышение мощности тета-ритма, снижение частоты α-ритма и инвертирование локализации α-активности. При этом после лечения мощность θ-активности приближалась к норме, а D2 речевого сигнала снижалась.

Наиболее заметные изменения наблюдались у пациентов с паническим расстройством: структура ЭЭГ в состоянии покоя характеризовалась сниженной мощностью α-ритма и повышенной долей δ- и β-ритмов, причем после лечения изменений не происходило. Частоты α- и θ-ритмов были ниже нормы, пространственное распределение α-активности было смещено к центральным областям, а после лечения еще сильнее сместилось к фронтально-центральным областям. Нелинейная характеристика речевого сигнала D2 характеризовалась отсутствием межиндивидуальной вариабельности, при этом после лечения значения D2 повысились только у данной группы пациентов.

Литература

Авербух Е.С. Депрессивные состояния: диагностика, патогенез, лечение. Л.: ЛГУ, 1962. 194 с.

Бажин Е.Ф., Галунов В.И., Горский Г.Д., Манеров В.Х. Объективная диагностика эмоционального состояния в психиатрической клинике по речи // Речь и эмоции. Л., 1975. С. 69-74.

Бехтерева Н.П. Электроэнцефалография в клинике // Физиологические методы в клинической практике. Л.: Медицина, 1966. С. 293-344.

Вертоградова О.П. Возможные подходы к типологии депрессий // Депрессия (психопатология, патогенез). М.: МНИИП, 1980. С. 9-23.

Вертоградова О.П., Войцех В.Ф., Краснов В.Н., Синицин В.Н., Суворов А.К. Возрастные особенности депрессий второй половины жизни // Невропатол. и псих. им. С.С. Корсакова. 1986. Т. 86. Вып. 9. С. 1380-1384.

Виноградова О.С. Гиппокамп и память. М.: Наука, 1975. 333 с.

Витт Н.В. Информация об эмоциональных состояниях в речевой интонации // Вопросы психологии. 1965. № 3. С. 89-103.

Галагудзе С.С. Лексико-грамматические характеристики устной спонтанной речи как средство психодиагностики // Диагностика психических состояний в норме и патологии. Л.: Медицина, 1980. С. 45-53.

Гриндель О.М., Брагина М.М., Добронравова И.С., Доброхотова Т.А. Генерализованная ритмическая тета-активность в ЭЭГ человека при поражении срединно-базальных структур мозга // Основные проблемы электрофизиологии головного мозга. М.: Наука, 1974. С. 261-274.

Дмитриева Е.С., Гельман В.Я. Связь восприятия эмоциональной интонации речи в условиях помех с акустическими параметрами речевого сигнала у взрослых разного пола и возраста // ЖВНД. 2011. Т. 61. № 3. С. 306-316.

Дмитриева Е.С., Гельман В.Я, Зайцева К.А, Орлов А.М. Онтогенетические особенности психофизиологических механизмов восприятия эмоционального компонента речи у музыкально одаренных детей // ЖВНД. 2004. Т. 54. № 5. С. 581- 591.

Дмитриева Е.С., Гельман В.Я., Зайцева К.А., Орлов А.М. Влияние индивидуальных особенностей человека на акустические корреляты эмоциональной интонации речи // ЖВНД. 2009. Том 59. № 5. С. 538-546.

Ераценко Н.А., Вельтищев Д.Ю. Изменения параметров темпа речи в динамике депрессий // ЖВНД. 1991. Т. 41. Вып. 4. С. 691-699.

Зайдель К., Кулавик Х., Шахматов Н.Ф., Боброва И.Н. Маниакально-депрессивный психоз // Руководство по психиатрии. М.: Медицина, 1988. С. 503-504.

Ивонин А.А., Куценко Д.О., Богданов Н.Н., Шуваев В.Т., Ноздрачев А.Д. Особенности организации биопотенциалов коры головного мозга и вегетативного статуса у человека при невротической депрессии // Физиология человека. 2012. Т. 38. № 1. С. 20-32.

Изнак А.Ф., Никишова М.Б. Электрофизиологические корреляты психогенных расстройств // Физиология человека, 2007. Т. 33. № 2. С. 137-139.

Изнак А.Ф., Изнак Е.В., Корнилов В.В., Концевой В.А. Нейропсихофизиологические корреляты реактивной депрессии // Физиология человека. 2011. Т. 37. № 6. С. 46-53.

Изнак А.Ф., Тиганов А.С., Изнак Е.В., Сорокин С.А. ЭЭГ-корреляты и возможные предикторы эффективности терапии эндогенной депрессии // Физиология человека. 2013. Т. 39. № 4. С. 49-57.

Кербиков О.В. Избранные труды. М.: Медицина, 1971. 312 с.

Лебедева Н.Н., Каримова Е.Д., Казимирова Е.А. Акустические характеристики речи и индивидуальные особенности человека // Биомедицинская радиоэлектроника. 2013. № 6. С. 29-35.

Лукьянов А.Н., Фролов М.В. Сигналы состояния человека-оператора. М.: Наука, 1969. 247 с.

Лурия А.Р. Основы нейропсихологии. М.: МГУ, 1973. 374 с.

Михайлова Е.С. Исследование вегетативных показателей у больных с различными вариантами депрессий в условиях эмоционального напряжения // Депрессия (психопатология, патогенез). М.: МНИИП, 1980. С. 88-95.

Монахов К.К., Бочкарев В.К., Никифоров А.И. Прикладные аспекты нейрофизиологии в психиатрии. М.: Медицина, 1983. 192 с.

Морозов В.П. Искусство и наука общения: невербальная коммуникация. М., ИП РАН, 1998а. 160 с.

Морозов В.П. Невербальная коммуникация в системе речевого общения. Психофизиологические и психоакустические основы. М.: ИП РАН, 1998б.

Никонов А.В. К проблеме акустической диагностики функциональных состояний человека-оператора // Психологические и психофизиологические исследования речи. М.: Наука, 1985. С. 161-175.

Носенко Э.Л. К проблеме эмоциональной вариативности речи // Речь и эмоции. Л., 1975. С. 61-67.

Омельченко В.П., Заика В.Г. Изменение ЭЭГ-ритмов при эндогенных депрессивных расстройствах и влияние фармакотерапии // Физиология человека. 2002. Т. 28. № 3. С. 30-36.

Орехов Ю.В., Голикова Ж.В., Стрелец В.Б. Психофизиологические показатели мысленного воспроизведения эмоциональных состояний в норме и у больных при первом приступе депрессии // ЖВНД. 2004. Т. 54. № 5. С. 612-619.

Саркисов Д.С., Гельфанд В.Б., Туманов В.П. Теоретические и практические аспекты проблемы соотношения структуры и функции // Руководство по психиатрии. М.: Медицина, 1988. С. 51-74.

Сидоров К.В., Филатова Н.Н. Анализ признаков эмоционально-окрашенной речи // Вестник ТвГТУ, 2012. № 180. Вып. 20. С. 26-32.

Скляров О.П. Фракталы и крупномасштабная временная структура акустического речевого сигнала и музыки // Электронный журнал «Техническая акустика». 2004. № 21. С. 1-10.

Стрелец В.Б., Данилова Н.Н., Корнилова И.В. Ритмы ЭЭГ и психологические показатели эмоций при реактивной депрессии // ЖВНД. 1997. Т. 47. Вып. 1. С. 11-21.

Таубкин В.Л. Некоторые результаты исследования интонационных характеристик главноударных звуков эмоциональной речи // Речь, эмоции, личность. М., 1978. С. 183-187.

Фант Г. Акустическая теория речеобразования. М.: Наука, 1964.

Фролов М.В., Кориневская И.В., Потулова Л.А. Анализ депрессивных состояний с помощью временных характеристик речи // Физиология человека. 1994. Т. 20. № 6. С. 53-63.

Фролов М.В., Кориневская И.В., Мехедова А.Я., Милованова Г.Б., Потулова Л.А., Шаров Ю.В. Диагностика функциональных и депрессивных состояний по характеристикам интонации и временного потока речи // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2004. № 12. С. 8-15.

Фролов М.В., Кориневская И.В., Сидорова О.А., Милованова Г.Б. Анализ речевых сигналов в оценке нарушений эмоциональных состояний человека // Биомедицинская радиоэлектроника. 2005. № 1-2. С. 3-12.

Andreasen N.C., Pfohl B. Linguistic analysis of speech in affective disorders // Arch. Gen. Psychiatry. 1976. № 12. P. 374-378.

Bachorowski J.-A., Owren MJ. The role of vocal acoustics in emotional intelligence // The Wisdom of Feelings: Processes Underlying Emotional Intelligence. Eds. L.F. Barrett, P. Salovey. NY: Guilford, 2002.

Baro F. The diagnosis and classification of depression // Acta. Psychiat. Belg. 1978. № 78. P. 736.

Cummins N., Epps J., Breakspear M., Goecke R. An investigation of depressed speech detection: features and normalization // INTERSPEECH, ISCA. 2011. P. 2997-3000.

Derogatis L.R. Anxiety and depressive disordes in the medical patent. Washington, DC: Am. Psychiatr. Press, 1989. P. 26-27.

Forsell M. Acoustical correlates of perceived emotions in speech // Master of Science Thesis. Stockholm, Sweden, 2007.

Frijda N. Recognition of emotion // Advances in Exp. Soc. Psychol. 1969. Vol. 4. P. 167-223.

Hutt C., Coxon M.W. Systematic observation in clinical psychology // Arch. Gen. Psychiatry. 1965. № 33. P. 1361-1367.

Kniffki K.Q., *Mandel W., Tran Fia P.* Temporal fluctuation in biorhythms: expression of self-organized criticality? // Fractals. 1993. Vol. 1. № 3. P. 380-388.

Lorens M., Cobb S. Language behavior in maniac patients // Arch. Neurol. Psychiatry. 1952. № 69. P. 763-770.

Mahl G.F. The lexical and linguistic levels in the expression of emotion // Expression of the Emotion in Men. NY, 1963. P. 77-105.

Mandelbrot B.B. Fractals: form, chance and dimension // San Francisco Freeman. 1977.

Morozov V. P. Emotional expressiveness of the Singing Voice: the role of macrostructural and microstructural modifications of spectra // Scand. J. Log. Phon. MS. 1996. № 150. P. 1-11.

Moses P. Emotional causes of vocal pathology // Psychol. and Psychiatr. Aspects of Speech and Hearing. Springfield. 1960. P. 204-231.

Mundt J.C., Vogel A.P., Feltner D.E., Lenderking W.R. Vocal acoustic biomarkers of depression severity and treatment response // Biol. Psych. 2012. Vol. 72. P. 580-587.

Murray J.L., Lopez A.D. The global burden disease: a comprehensive and risk factors in 1990 and project to 2020 (Summary). WHO, World Bank, Harvard School of Public Health, 1996.

Nilsonne A. Acoustic analysis of speech variables during depression and after improvement // Acta Psychiatr. Scand. 1987. Vol. 76. № 3. P. 235-245.

Ostwald P.F. Soundmaking: The acoustic communication of emotion. Springfield, III, Charles C. Thomas. 1963. 386 p.

Owren M.J., Rendall D., Bachorowski J-A. Conscious and unconscious emotion in nonlinguistic vocal communication. Guilford. Eds. B.P. Niedenthal, P. Winkielman. NY: Emotion and Consciousness, 2005. P. 185-204.

Petri L. Vocal expression of emotion // Discrete-Emotions and Dimensional Accounts. Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Social Sciences. 2004. Vol. 141. P. 80.

Pull C., Pichot P., Overal J.E., Pull M.C. Conceptual validation of a psychiatric syndrome classification // Ann. Med. Psychol. 1977. Vol. 135. № 1. P. 102.

Rothkrantz L.J.M., Wiggers P., van Wees J.W.A., van Vark R.J. Voice stress analysis // Proceedings of Text, Speech and Dialogues. 2004.

Sanchez M.H., *Vergyri D., Ferrer L. et al.* Using prosodic and spectral features in detecting depression in elderly males // INTERSPEECH. 2011. P. 3001-3004.

Satoh K., Kobayashi T., Yana K. Fractal dimension of fluctuations in fundamental period of speech // Noise in Physical Systems and 1/f fluctuations. Eds. T. Musha, S. Sato, Yamamoto M. Ohmsha Ltd, 1991. P. 505-508.

Scherer K.R., Johnstone T., Klasmeyer G. Vocal expression of emotion // Scherer. Handbook of the Affective Sciences. Eds. R.J. Davidson, H. Goldsmith, K.R. Scherer. NY: Oxford University Press, 2003. P. 433-456.

Stoddard F.J., Post R.M., Bunney W.E. Jr. Slow and rapid psycho-biological alterations in a maniac-depressive patient: clinical phenomenology // Br. J. Psychiatry. 1977. № 130. P. 78-82.

Stussen H.H., Bomben G. Affective state and voce: reproducibility and sensitivity of speech parameters // Methods of Information in Medicine. 1988. № 27. P. 87-96.

Vacca L., Kemali D., Marciano F. et al. Quantitative EEG analysis in schizophrenics and depressed patients // Adv. Biol.Psychiatr. Basel: Karger, 1980. Vol. 4. P. 111.

Vassa L., Kemali D., Marciano F. et al. Quantitative EEG analysis in schizophrensis and depressed patients // Adv. Biol. Psychiatr. Basel: Karger, 1980. Vol. 4. P. 111.

Voss R., Clarce J. 1/f noise in music and speech // Nature. 1975. Vol. 258. P. 317-318.

Williamson J.R. et al. Vocal biomarkers of depression based on motor incoordination // AVEC' 13 Proceedings of the 3rd ACM International Workshop on Audio/Visual Emotion Challenge. 2013. P. 41-48.

Особенности μ-ритма ЭЭГ при шизофрении и аутизме

В.Б. Стрелец, Ж.В. Гарах, В.Ю. Новотоцкий-Власов, О.Ю. Хаердинова, Е.А. Лущекина, В.С. Лущекин

Содержание

1. Введение
2. Метод пространственно-спектрального выделения μ-ритма
3. Анализ спектральной мощности μ-ритма в фоне
4. Анализ спектральной мощности μ-ритма при представлении движения
5. Межполушарная асимметрия μ-ритма
6. Подавление μ-ритма при представлении движения
7. Заключение

1. Введение

Шизофрения и ранний детский аутизм представляют собой гетерогенные заболевания, в которых участвуют как генетический фактор, так и ранние стрессы со стороны окружающей среды (Andreasen, 2001; Uhlhaas, Singer, 2010; Matson et al., 2011). Шизофрения – наиболее разрушительное из всех психических заболеваний, которым, по статистике, страдает 1% населения. В настоящее время существуют различные точки зрения на природу аутизма. Некоторые авторы полагают, что аутизм является отдельным заболеванием; другие полагают, что детский аутизм может предшествовать развитию шизофрении или являться одним из вариантов шизофрении, поскольку в клинике расстройств аутистического спектра (РАС) показана возможность появления позитивных симптомов и перехода РАС в процессуальное расстройство (Башина, 1999; Тиганов, Башина, 2005). Исторически РАС было выделено из расстройств шизофренического круга и стал рассматриваться как самостоятельное заболевание. Первые упоминания об аутистических симптомах в круге шизофрении и шизоидных личностных расстройств встречаются в работах Г. Сухаревой (1925), Т. Симсон (1929), позже – в работе М. Вроно (Вроно, Башина, 1975). Представление об аутистическом расстройстве как отдельной клинической единице сформировалось после его описания Л. Каннером (Kanner, 1944). Из современной научной литературы известно, что у детей, больных РАС, нарушается перцептивно-когнитивная переработка информации и формирование внутреннего образа внешнего раздражителя, что препятствует адекватной оценке действительности и адаптивному поведению (Dinstein et al., 2010). Аутизм связан с нарушениями в интеграции получаемой информации, вызываемыми утратой связей между специализированными локальными нейронными сетями, а также излишними связями внутри изолированных нейронных ансамблей (Rippon et al., 2007). Подобные нарушения находят и при шизофрении (Strelets et al., 2002, Uhlhaas et al.,2010; Mo-

Сокращения: РАС – расстройства аутического спектра.

ran, Hong, 2011 и др.). Знания о сходстве и различиях этих расстройств смогут помочь в их ранней диагностике и лечении. На сегодняшний момент доклиническая диагностика шизофрении является одной из наиболее трудных задач. До настоящего времени остаются неисследованными общие черты и различия нейрофизиологических механизмов некоторых когнитивных функций у детей с аутизмом и больных шизофренией (первый эпизод заболевания).

Ранее нами было показано, что у больных аутизмом мощность α-ритма в фоне снижена по сравнению с нормой, особенно в правом полушарии, а мощность γ-ритма – повышена (Лущекина и др., 2011, 2013). Было обнаружено, что нарушения синхронизации и мощности, особенно в полосе γ-частот, являются фундаментальными особенностями нейрофизиологических механизмов шизофрении (Strelets et al., 2002). Была высказана гипотеза о том, что сопряженность характеристик симметрии мощности и синхронизации мозговых ритмов является необходимым условием нормального восприятия, когнитивной деятельности и поведения (Стрелец и др., 2006, 2007; Стрелец, 2009). В ходе выполнения проекта «Фундаментальные науки – медицине» 2012 года нами было выявлено, что характеристики спектральной мощности и когерентности γ-ритма у детей с РАС и взрослых больных с негативной симптоматикой имеют сходство, что подтверждается и клиническими проявлениями этих заболеваний.

Аутизм и шизофрения в значительной мере характеризуются дефицитом социальных и коммуникативных навыков, внутренней модели сознания другого («Theory of Mind»), подражания, эмпатии. Исследования показывают, что в основе этих нарушения может лежать дисфункция системы зеркальных нейронов. Так, работы с использованием методов нейровизуализации продемонстрировали при шизофрении и аутизме сниженную активность «зеркальных» клеток (Enticott et al., 2008; Park et al., 2011 и др.).

Зеркальные нейроны представляют собой класс клеток, первоначально найденных в поле F5 премоторной коры макаки. Данные клетки разряжались как в случае выполнения обезьяной некоторого действия (например хватания), так и в случае, когда она наблюдала за тем, как это действие выполняет экспериментатор или другая обезьяна. За эту их особенность Г. Ризолатти назвал эти клетки зеркальными. Позже клетки со сходными характеристиками были найдены также в передней части нижней височной дольки (зона PF) (Rizzolatti, Craighero, 2004). Существует большое количество нейрофизиологических работ и работ с использованием методов нейровизуализации, позволяющих предположить существование в мозге человека подобной системы зеркальных нейронов, которая принимает также участие в основанной на подражании форме понимания мысленных состояний других. Это заставляет предположить, что зеркальные нейроны кодируют также и намерение, связанное с наблюдаемым действием (Iacoboni, Mazziotta, 2007).

Активность зеркальных нейронов можно изучать посредством анализа μ-ритма ЭЭГ (8–13 Гц) (Muthukumaraswamy et al., 2004). Так, было обнаружено изменение электрической активности в сенсомоторной коре во время движений руки испы-

туемого (Gastaut, Bert, 1954), а также при наблюдении за двигающейся рукой другого человека (Pineda et al., 2000; Muthukumaraswamy et al., 2004; Pfurtscheller et al., 2006). Данные факты могут свидетельствовать о том, что во время выполнения движения или наблюдения за ним сенсомоторные нейроны асинхронно активируются, что проявляется как подавление спектральной мощности μ-ритма (Salmein et al., 1994). Подавление μ-ритма при моторной деятельности в настоящее время считается вероятностным индексом активности зеркальных нейронов (Hari et al., 1998). Было показано, что μ-ритм в центральных корковых областях снижается не только при инициировании движений, но и при их представлении (моторное воображение) и наблюдении за чьими-либо движениями (Babiloni et al., 1999; Pineda et al., 2000). Такие исследования проводились в основном на здоровых испытуемых. Таким образом, феноменология μ-ритма имеет заметное сходство с феноменологией активности зеркальных нейронов. Оба явления чувствительны к движению, а также к восприятию моторных образов, например наблюдению осмысленных движений. Их частично совпадающие анатомические субстраты в сенсомоторных лобно-теменных сетях поддерживают предположение о том, что они играют определенную роль в связи с восприятием и движением, которая может лежать в основе более высокоуровневых процессов (Pineda, 2005).

У больных аутизмом в единичных работах продемонстрировано снижение по сравнению с нормой подавления μ-ритма при выполнении движений (Oberman, Ramachandran, 2008; Martineau et al., 2008). Исследования нарушения подавления μ-ритма у больных шизофренией малочисленны и противоречивы (Singh et al., 2011), они показали сниженное по сравнению со здоровыми испытуемыми подавление μ-ритма при наблюдении за движением, а в работе (McCormick et al., 2012), напротив, отмечено увеличенное подавление μ-ритма сенсомоторного кортекса левого полушария при исследовании эмпатии.

До настоящего времени остаются неисследованными общие черты и различия нейрофизиологических механизмов дефицита социальных и коммуникативных функций у детей с аутизмом и больных шизофренией. Нет также четкого представления о характере нарушений показателя подавления μ-ритма при этих заболеваниях. В основе исследования лежит представление о том, что система зеркальных нейронов, принимающая участие в восприятии и понимании движений, также играет важную роль в когнитивных процессах высшего порядка, таких как имитация, эмпатия, языковые и социальные навыки, которые нарушены у лиц с расстройствами и шизофренического, и аутистического спектров. Поскольку μ-колебания частотой 8–13 Гц сенсомоторной коры, как считается, отражают активность зеркальных нейронов, исследование изменения этого ритма ЭЭГ на фактическое, наблюдаемое или воображаемое движение может служить одним из методов проверки целостности функционирования системы зеркальных клеток при этих заболеваниях.

Таким образом, цель настоящего исследования – выявить общие черты и различия характера изменений μ-ритма при представлении или наблюдении за движением у детей с расстройствами аутистического спектра и взрослых больных шизофренией с первым приступом заболевания.

2. Метод пространственно-спектрального выделения μ-ритма

Характеристика используемого в работе подхода: в предыдущих исследованиях μ-ритм рассматривался в структуре α-ритма (в том же частотном диапазоне 8–13 Гц, но в центральных отведениях), вместе с тем имеются существенные отличия от α-ритма. Кортикальный источник α-волн находится в теменно-затылочной коре, в то время как μ-волны распространяются вдоль соматосенсорной коры (Hari et al., 1998). В сравнении с α-ритмом, μ-ритм не снижается при зрительной стимуляции, но ослабляется с началом моторной активности (Gastaut, 1952). Для обнаружения и выделения μ-ритма ЭЭГ человека по записи ЭЭГ в условиях воображаемого движения нами был предложен метод и создана специальная программа (свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2012618160 «Пространственно-спектральное выделение μ-ритма электроэнцефалограммы человека» Авторы: Новотоцкий-Власов В.Ю., Гарах Ж.В., Зайцева Ю.С., Гурович И.Я., Стрелец В.Б. (2012 г.). Программа может применяться для определения характеристик (топографии и мощности) μ-ритма в экспериментальных и клинических исследованиях, по условиям которых затруднительно или невозможно использование дополнительных функциональных нагрузок.

Программа обеспечивает выполнение следующих функций:

– выявление μ-ритма по характерной реакции на открывание глаз и выполнение воображаемого движения;

– определение топографии μ-ритма;

– пространственно-частотную фильтрацию ЭЭГ для выделения μ-ритма в чистом виде.

Исследование проводилось на базе ФГУ «Московский НИИ психиатрии Минздравсоцразвития» (отделение 1-го эпизода болезни) и Центра психолого-медико-социального сопровождения детей и подростков «Северо-запад», на базе которого нами проводится электроэнцефалографическое и психологическое обследование детей с РАС.

В группу больных шизофренией и расстройствами шизофренического спектра вошел 141 человек в возрасте от 17 до 54 лет в подостром состоянии. Диагноз ставился клиницистами отделения первого эпизода болезни по Международной классификации МКБ-10. Все пациенты получали терапию атипичными антипсихотиками в течение 3–20 дней. У больных шизофренией определялось преобладание позитивных или негативных симптомов по шкале PANSS. Такое разделение больных на две группы позволяет более точно проанализировать нейрофизиологические механизмы когнитивных дисфункций при продуктивной и дефицитарной симптоматике. По шкале PANSS к позитивным симптомам относятся: бред, расстройства мышления, галлюцинации, возбуждение, идеи величия, подозрительность, враждебность. К негативным симптомам относятся: притупленный аффект, эмоциональная отгороженность, трудности в общении, пассивно-апатическая социальная отгороженность, нарушения абстрактного мышления, нарушения спонтанности и плавности речи, стереотипное мышление. По каждой из шкал вычислялась сумма баллов выраженности каждого симптома.

В качестве контрольной группы здоровых испытуемых исследовано 112 здоровых испытуемых в возрасте от 17 до 57 лет.

В исследование отбирались, как в группу контроля, так и в группу больных шизофренией и расстройствами шизофренического спектра, соматически здоровые правши. Статистически значимых различий по полу, возрасту и уровню образования между исследованными группами не обнаружено ($p>0,1$).

С помощью созданного нами метода μ-ритм из комплекса с α-ритмом выделился у 90% испытуемых. Таким образом, в группы сравнения вошло 126 человек больных шизофренического спектра с первым эпизодом болезни (69 мужчин и 57 женщин, средний возраст – 26,1 лет) и 100 человек здоровых испытуемых (53 мужчины и 47 женщин), средний возраст – 26,52 года.

В группу детей, страдающих расстройствами аутистического спектра, включено 8 человек в возрасте 5–7 лет. Контрольная группа здоровых детей того же возраста – 25 человек.

Все испытуемые (или родители обследуемых детей) давали письменное согласие на участие в исследовании.

ЭЭГ у всех испытуемых регистрировали в состоянии покоя (с закрытыми глазами), при открытых глазах и в процессе выполнения задачи на мысленное представление собственного движения (глаза закрыты). В инструкции испытуемому предлагалось представить, как он идет по хорошо знакомой дороге. Регистрацию ЭЭГ при предъявлении теста проводили с последующим контролем полученных результатов. Испытуемые во время записи ЭЭГ сидели в кресле в затемненной, относительно звукоизолированной, экранированной камере.

Электроды располагали по международной схеме 10–20%. Фильтры высоких частот были установлены на 70 Гц, постоянная времени – 0,3 с, частота квантования 200 Гц. Запись ЭЭГ проводили от 19 отведений: Fp1, Fp2, F3, F4, F7, F8, C3, C4, T3, T4, T5, T6, P3, P4, O1, O2, Fz, Cz и Pz на установке, состоящей из 19-канального усилителя фирмы МБН (Москва) и персонального компьютера (частота опроса 200 Гц). Запись монополярная. Референтные электроды – ушные. ЭЭГ регистрировали в течение 120 с в каждом функциональном состоянии. При расчете спектральных показателей проводили усреднение данных анализа 10–15 эпох длительностью 5 с.

Для подавления ЭОГ (электроокулограммы), пульсовых и других артефактов использовали метод, представляющий собой сочетание двух методик, реализуемых последовательно: фильтрация ЭЭГ и обработка результатов с помощью разновидности факторного анализа – метода главных компонент (Новотоцкий-Власов и др., 2007).

В работе сравнивались показатели спектральной мощности μ-ритма между группами здоровых испытуемых и больных шизофренией, между группами больных шизофренией с преобладанием негативной и позитивной симптоматики, а также между группами здоровых детей и детей с РАС. Статистическая обработка полученных спектральных показателей проводилась с помощью пакета программ STATISTICA 6.0. Исследовали спектральную мощность μ-ритма ЭЭГ в центральных и фронтальных корковых областях. В качестве анализируемого показателя использовали натуральный логарифм спектральной мощности для нормализации данных. Статистическая обработка проводилась с помощью критерия Стьюдента.

Исследование подавления μ-ритма у взрослых здоровых испытуемых и больных шизофренией при когнитивных нагрузках проводили для проекций сенсомоторной зоны – в областях C3, C4 и Cz, а также во фронтальных областях – Fp1, Fp2, F3, F4, F7 и F8. Анализировали показатель подавления μ-ритма по сравнению с состоянием покоя. Необходимо отметить, что в парадигмах исследования воображаемого движения до настоящего времени использовали сравнение электрофизиологических показателей при реальном выполнении двигательного акта и воображаемом. Лишь в одной работе применяется сопоставление с состоянием покоя (Höller et al., 2013). Авторы в своей работе отметили перспективность данного сопоставления.

3. Анализ спектральной мощности μ-ритма в фоне

Согласно картам распределения спектральной мощности, в норме μ-ритм распределен неравномерно по поверхности коры. Высокие значения у здоровых детей регистрировались в левом лобном отведении F3 (3,034 мкв^2/Гц), в заднелобном отведении F7 (2,242 мкв^2/Гц) и в переднелобном отведении Fp1 (1,438 мкв^2/Гц). У детей, страдающих расстройствами аутистического спектра, высокие значения мюритма регистрировались в правом лобном отведении F4 (5,636 мкв^2/Гц), в правом переднелобном отведении Fp2 (4,502 мкв^2/Гц) и в правом лобно-височном отведении F8 (4,317 мкв^2/Гц). При этом спектральная мощность у больных детей почти в 2 раза превышает нормальные значения.

Сравнение спектральной мощности μ-ритма у взрослых здоровых испытуемых и больных шизофренией в состоянии спокойного бодрствования выявило, что этот показатель больше у больных, чем у здоровых, во всех исследуемых корковых областях, кроме C3: Fp1 ($p<0,05$), Fp2 ($p<0,05$), F3 ($p<0,01$), F4 ($p<0,01$), F7 ($p<0,0001$), F8 ($p<0,05$), C4 ($p<0,001$), Fz ($p<0,01$) и Cz ($p<0,01$). При сравнении данного показателя у больных шизофренией с преобладанием позитивной и негативной симптоматики достоверных различий не обнаружено.

Следовательно, обнаружено, что и у детей с ранним детским аутизмом, и у взрослых больных шизофренией и расстройствами шизофренического спектра спектральная мощность μ-ритма в состоянии спокойного бодрствования больше, чем у здоровых испытуемых.

4. Анализ спектральной мощности μ-ритма при представлении движения

У детей с аутизмом при представлении движения мощность μ-ритма была больше, чем у здоровых детей того же возраста ($p<0,05$).

В состоянии спокойного бодрствования спектральная мощность μ-ритма была больше у больных шизофренией, чем у здоровых испытуемых во всех корковых областях ($p<0,05$), кроме C3. При сравнении данного показателя у больных ши-

зофренией с преобладанием позитивной и негативной симптоматики достоверных различий не обнаружено, кроме правой префронтальной корковой области (Fp2), где мощность μ-ритма была больше у больных с преобладанием позитивных симптомов на уровне тенденции ($p<0,06$).

Таким образом, как и в состоянии спокойного бодрствования, так и при представлении движения, у детей с ранним детским аутизмом и у взрослых больных шизофренией спектральная мощность μ-ритма больше, чем у здоровых испытуемых.

5. Межполушарная асимметрия μ-ритма

Показано, что в состоянии спокойного бодрствования с закрытыми глазами и при представлении движения фокус μ-активности у здоровых детей локализуется во фронтальной области левого полушария, а у детей с расстройствами аутистического спектра – правого (рис. 1).

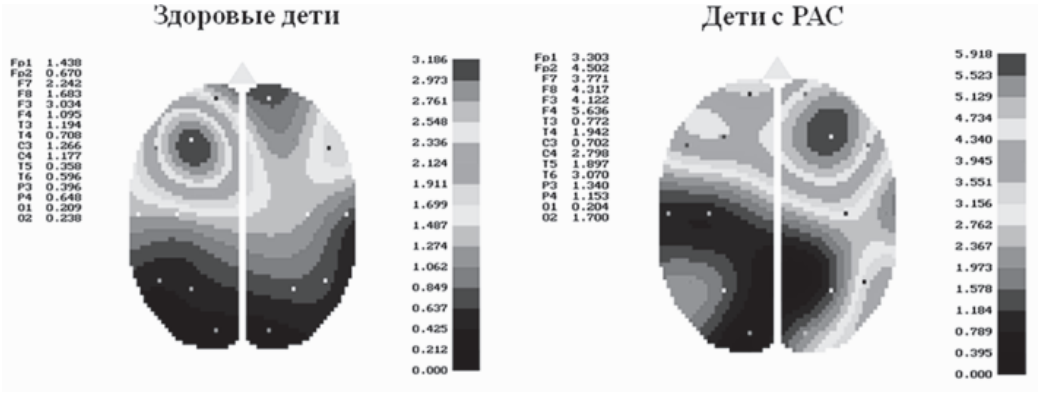


Рис. 1. В состоянии спокойного бодрствования с закрытыми глазами фокус μ-активности у здоровых детей локализуется в отведении F3 левого полушария, а у детей с расстройствами аутистического спектра в отведении F4 правого полушария

При этом спектральная мощность у больных детей почти в 2 раза превышает нормальные значения

У взрослых здоровых испытуемых выявлена асимметрия спектральной мощности μ-ритма как в состоянии покоя (рис. 2), так и при представлении собственного движения только в центральных корковых зонах: C3>C4 ($p<0,0001$). Во фронтальных областях коры головного мозга у здоровых испытуемых межполушарной асимметрии мощности μ-ритма в покое и при выполнении задания не было. У больных шизофренией и расстройствами шизофренического спектра межполушарной асимметрии спектральной мощности μ-ритма ни в фоне, ни при представлении движения не обнаружено.

Следовательно, и у взрослых больных шизофренией с первым эпизодом, и у детей с расстройствами аутистического спектра обнаружено нарушение преобладания спектральной мощности μ-ритма в левом полушарии.

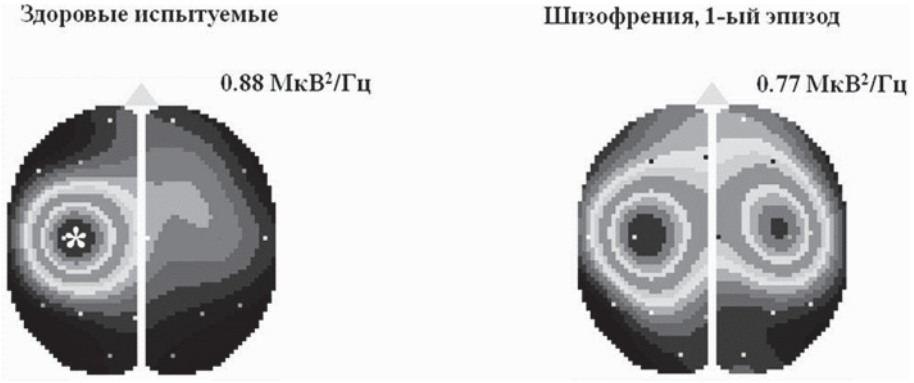


Рис. 2. Максимум μ-ритма имел локализацию в центральных корковых областях у всех испытуемых

У здоровых испытуемых мощность μ-ритма ЭЭГ во всех функциональных пробах больше в левом полушарии ($p<0,0001$), тогда как у больных шизофренией межполушарной асимметрии этого показателя не обнаружено

6. Подавление μ-ритма при представлении движения

Подавление μ-ритма при моторном воображении по сравнению с фоном было выражено как у здоровых детей, так и у детей с РАС. Однако если у здоровых детей μ-ритм при представлении движения снижался почти в 3 раза, то у детей с РАС – только в 0,5 раза. Следовательно, показатель подавления μ-ритма у детей с аутизмом был выражен меньше, чем в норме.

У здоровых взрослых испытуемых подавление спектральной мощности μ-ритма при представлении движения в уме по сравнению с состоянием спокойного бодрствования было выражено во всех исследуемых корковых зонах, кроме правой фронтальной области (F4). В отведениях Fp1, Fp2, F3, F8, C3, C4, Fz и Cz уровень значимости достигал $p<0,000001$, в отведении F7 – $p<0,01$. У больных шизофренией также показатель подавления μ-ритма при представлении собственного движения был выражен во всех фронтальных и центральных корковых зонах не избирательно ($p<0,000001$).

Далее мы проводили сравнение разницы спектральной мощности μ-ритма в функциональной пробе при представлении собственного движения и в состоянии спокойного бодрствования, то есть характеристики подавления этого показателя. Подавление μ-ритма было выражено меньше у больных шизофренией по сравнению со здоровыми испытуемыми в правой центральной области C4 ($p<0,01$), а также на уровне тенденции в левой центральной ($p<0,06$) и правой передневисочной F8 ($p<0,07$) корковых областях. В остальных исследованных зонах сниженное подавление μ-ритма при представлении движения у больных шизофренией по сравнению со здоровыми испытуемыми не достигало уровня значимости.

Сравнение этого показателя у больных шизофренией с преобладанием негативной и позитивной симптоматики показало, что подавление μ-ритма при представлении движения меньше выражено при наличии позитивных симптомов. Значимые

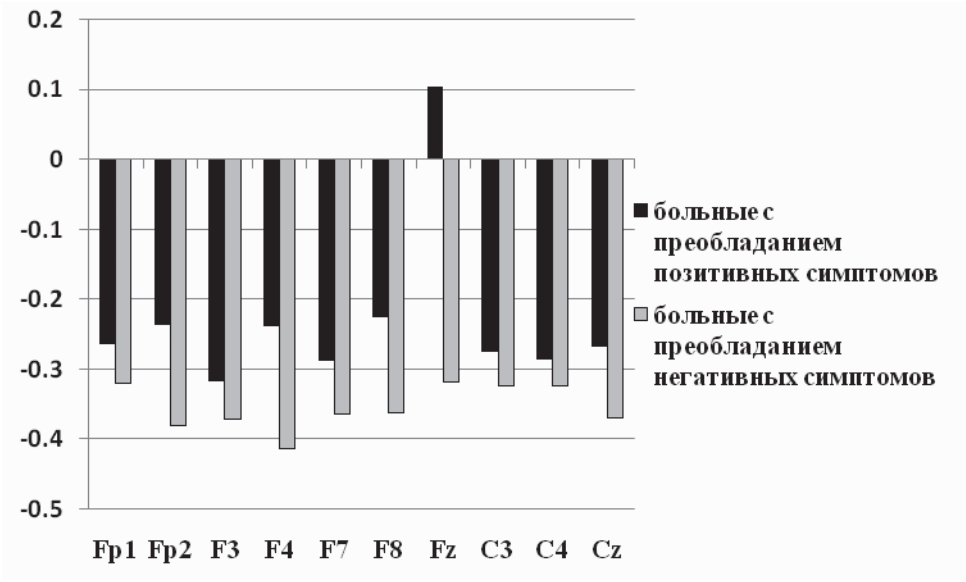


Рис. 3. Различия подавления μ-ритма у двух групп больных шизофренией

Ось ординат – изменение натурального логарифма спектральной мощности μ-ритма при моторном воображении по сравнению с фоном. Ось абсцисс – корковые области

различия обнаружены в префронтальной Fp2 ($p<0,05$), фронтальной F4 ($p<0,05$) и передневисочной F8 ($p<0,05$) областях правого полушария (рис. 3).

7. Заключение

Полученные в работе показатели нарушения спектральной мощности μ-ритма ЭЭГ при шизофрении и аутизме могут свидетельствовать об отсутствии целостности функционирования системы «зеркальных» клеток у этих больных.

В нашей работе после выделения μ-ритма его максимум имел локализацию в центральных корковых областях, в отличие от α-ритма. И у здоровых испытуемых, и у больных шизофренией отмечалось выраженное подавление μ-ритма при представлении собственного движения в уме, но не при открывании глаз и счете. Таким образом, впервые в мировой практике выполнено выделение μ-ритма из «смеси» с α-ритмом.

У здоровых испытуемых мощность μ-ритма ЭЭГ в фоне и во всех функциональных пробах была больше в левом полушарии, тогда как у больных шизофренией межполушарной асимметрии этого показателя не обнаружено. Этот факт согласуется с данными о левостороннем преобладании мощности μ-ритма у здоровых детей в фоне, но отсутствии асимметрии у детей с аутизмом (Stroganova et al., 2007). Однако в нашем исследовании у детей с РАС имел место правополушарный фокус максимума μ-ритма во всех функциональных пробах. Отсутствие асимметрии скорее всего не специфично только для шизофрении и аутизма, так как

наблюдаются и у людей с синдромом Дауна, и при эпилепсии (Lewin et al., 1993). Асимметричное левостороннее распределение μ-ритма у правшей может быть связано с повышенным нисходящим контролем над сенсомоторными зонами левого полушария, в то время как снижение асимметрии – с нарушением такого контроля (Billeci et al., 2013).

Мы впервые получили данные о том, что спектральная мощность μ-ритма была больше у больных шизофренией, чем у контрольной группы испытуемых и в фоне, и при представлении движения преимущественно в правом полушарии. Такие характеристики μ-ритма не зависели от преобладания негативных или позитивных симптомов при шизофрении. Кроме того, у детей с аутизмом спектральная мощность μ-ритма почти в 2 раза превышает нормальные значения. В работе показано, что спектральная мощность μ-ритма у больных шизофренией и у детей с аутизмом больше, чем у здоровых испытуемых, что может означать более низкую активность у них системы «зеркальных» нейронов уже в фоне. Однако до настоящего времени дискутируется степень отражения в показателе подавления μ-ритма ЭЭГ при двигательных актах функционирования «зеркальных» нейронов, так как на «зеркальные» нейроны приходится только небольшой процент от общих нейронов любой области мозга, и они имеют локализацию не только в сенсомоторной коре (Braadbaart et al., 2013).

При шизофрении показатель подавления μ-ритма при представлении в уме движения был меньше, чем в норме. Сравнительный анализ подавления μ-ритма у больных с позитивными и негативными симптомами показал, что при преобладании позитивной симптоматики этот параметр меньше, чем при преобладании негативной. Существует мнение о том, что параметр подавления μ-ритма может коррелировать с выраженностью психотических симптомов: чем больше тяжесть психопатологической симптоматики, тем больше подавляется μ-ритм. Однако по сравнению со здоровыми испытуемыми этот показатель снижен (Singh, 2011). В другой работе, напротив, отмечено увеличенное подавление μ-ритма сенсомоторного кортекса левого полушария при исследовании эмпатии (McCormick et al., 2012).

Исследования функций зеркальных нейронов при шизофрении с использованием различных методов нейровизуализации показали, что у больных шизофренией наблюдается снижение их активности (Enticott et al., 2008), что может также ассоциироваться со сниженной способностью различать действия себя и других (Schurmann et al., 2007) или сопереживать (Varcin et al., 2010). Также предполагается, что сниженная степень эмпатии и социальной когниции при шизофрении может быть непосредственно связана с болезненным состоянием (острый психоз) (Andreasen et al., 1986; Frith, Corcoran, 1996; Fahim et al., 2004; Salvatore et al., 2007).

Одним из общих механизмов, лежащих в основе нарушений работы мозга при расстройствах аутистического спектра и шизофрении, является дисфункция системы зеркальных нейронов, приводящая к нарушению отношений «я–другой» (Bernier et al., 2013; Enticott et al., 2012; King, Lord, 2011; Martineau et al., 2010; Williams, 2008; Hamilton, 2013). На работе системы зеркальных нейронов базируется фундаментальная связь между выполнением движений и действий самим субъектом и прослеживанием за тем, как это делают другие (Marshall, Meltzoff, 2011). Эта

связь, позволяющая сравнивать себя с другими путем выявления сходства и различия в параметрах движений и действий, страдает при аутизме (Williams, 2008). Нарушение работы системы зеркальных нейронов проявляется на ЭЭГ в изменении μ-ритма. Мю-ритм частотой 8–13 Гц у взрослых и от 6 Гц у детей регистрируется в сенсомоторных областях коры и в норме изменяется по амплитуде при выполнении действий и при наблюдении за действиями другого человека. При шизофрении (King, Lord, 2011) и аутизме (Williams, 2008) работа системы зеркальных нейронов нарушена. Это проявляется в том, что у больных реакция зеркальных нейронов на собственное и чужое действие различается больше, чем в норме. Так, в норме у детей регистрируется левостороннее преобладание μ-ритма в сенсомоторных областях, а при аутизме этого преобладания не наблюдается (Stroganova et al., 2007). У аутистов при наблюдении за движением руки отмечается более выраженная, чем в норме, активация оперкулярной части нижней фронтальной борозды, принадлежащей к системе зеркальных нейронов (Martineau et al., 2010). При аутизме описано уменьшение кортикоспинальной возбудимости при наблюдении за жестом, по сравнению с наблюдением за неподвижной рукой. Это изменение является отражением уменьшения активности системы зеркальных нейронов в вентральной премоторной коре и нижней фронтальной борозде. Обнаруживается обратная корреляция между активностью зеркальных нейронов в этих областях мозга и выраженностью нарушений в социальной сфере (Enticott et al., 2012).

Различные субпопуляции зеркальных нейронов, имеющие различную локализацию, вносят разный вклад в становление социально когнитивных функций. Так, зеркальные нейроны, принимающие участие в кодировании направления движения, необходимы для развития внимания к собственным действиям и, следовательно, ориентированы на собственную личность. Другие подсистемы включены в различные типы социального обучения от простой «автоматической имитации», на основе которой наиболее вероятно формируется эмпатия, до обучения сложным формам поведения, основанным на имитации. Другая система, включающая области миндалины и орбитофронтальной коры, принимает участие в обеспечении представлений, связанных с «моделью психического» (Williams, 2008).

Полученные в настоящей работе данные о нарушении показателей μ-ритма при шизофрении и аутизме подтверждаются нашими предыдущими исследованиями о том, что характеристики спектральной мощности и когерентности у детей с РАС и взрослых больных с негативной симптоматикой имеют сходство, что подтверждается клиническими проявлениями этих заболеваний. Некоторые авторы предполагают, что дисфункция работы зеркальных нейронов может отражать нейрофизиологические характеристики дефицита связности работы различных отделов мозга, общие для аутизма и шизофрении (Enticott et al., 2008). Достижения в нейрофизиологических исследованиях аутизма и шизофрении дают все больше доказательств того, что их фенотипы могут перекрываться. Эти знания могут помочь в плане раннего выявления и лечения таких психических расстройств.

Таким образом, в работе показано отсутствие целостности функционирования системы «зеркальных» клеток у обеих групп больных (шизофрения и аутизм), что проявлялось в нарушениях межполушарной асимметрии и бóльших показателях

мощности μ-ритма ЭЭГ, чем у здоровых испытуемых. Подтверждено наше предположение о снижении подавления μ-ритма при представлении движения у больных шизофренией по сравнению со здоровыми испытуемыми.

Перспективность дальнейших исследований и инновационный характер работы определяется тем, что с помощью разработанного нами метода μ-ритм из смеси с α-ритмом выделяется в «чистом» виде у 90% испытуемых. Метод может быть использован в клинической практике, так как он является недорогим и простым в применении. Мы предполагаем, что использование данного метода может помочь получить новые данные в вопросах патогенеза аутизма и шизофрении. Исследование μ-колебаний сенсомоторной коры, отражающих активность зеркальных нейронов, может служить одним из методов проверки целостности функционирования системы зеркальных клеток при этих заболеваниях.

Литература

Башина В.М. Аутизм в детстве. М.: Медицина, 1999. 236 с.

Вроно М.Ш., Башина В.М. Синдром Каннера и детская шизофрения // Журнал неврол. и псих. 1975. Вып. 75. № 9. С. 1379-1383.

Лущекина Е.А., Подрезная Е.Д., Лущекин В.С., Новотоцкий-Власов В.Ю., Стрелец В.Б. Особенности спектральной мощности ЭЭГ у детей с ранним детским аутизмом и их связь с развитием различных симптомов шизофрении // ЖВНД. 2011. Вып. 61. № 5. С. 1-8.

Лущекина Е.А., Подрезная Е.Д., Лущекин В.С., Новотоцкий-Власов В.Ю., Стрелец В.Б. Сравнительное исследование тета и гамма-ритмов в норме и при раннем детском аутизме // ЖВНД. 2013. Вып. 63. № 4. С. 451-459.

Новотоцкий-Власов В.Ю., Гарах Ж.В., Ковалев В.П. Метод подавления повторяющихся артефактов в многоканальной записи ЭЭГ // Физиология человека. 2007. Вып. 33. № 2. С. 115-120.

Симсон Т.П. Невропатии и реактивные состояния младенческого возраста. М.-Л., 1929. С. 205.

Стрелец В.Б., Гарах Ж.В. Когнитивные дисфункции при шизофрении // Вестник РГНФ. 2009. Вып. 1. № 54. С. 130-137.

Стрелец В.Б., Гарах Ж.В., Корсакова Н.К.и др. Особенности гамма-ритма ЭЭГ и некоторых нейропсихологических нарушений у больных шизофренией // Социальная и клиническая психиатрия. 2006. Вып. 16. № 4. С. 55-60.

Стрелец В.Б., Новотоцкий-Власов В.Ю., Гарах Ж.В., Желиговский В.А., Каплан А.Я. Многопараметрический комбинаторный анализ ритмов ЭЭГ в норме и при шизофрении // ЖВНД. 2007. Вып. 57. № 6. С. 684-691.

Сухарева Г.Е. Шизоидные психопатии в детском возрасте // Вопросы педологии и детской психоневрологии. 1925. № 2. С. 157-187.

Тиганов А.С., Башина В.М. Современные подходы к пониманию аутизма в детстве // Журнал неврол. и псих. 2005. Вып. 101. № 8. С. 4-12.

Andreasen N.C. Brave New Brain. Oxford: Oxford Univ. Press, 2001. 370 p.

Andreasen N.C., Nasrallah H.A., Dunn V. et al. Structural abnormalities in the frontal system in schizophrenia. A magnetic resonance imaging study // Arch. Gen. Psychiatry. 1986. Vol. 43. P. 136-144.

Babiloni C., Curducci F., Cincotti F. et al. Human movement related potentials vs desyncronization of EEG alfa rhythm: a high resolution EEG study // Neuroimage. 1999. Vol. 10. P. 658-665.

Bernier R., Aaronson B., McPartland J. The role of imitation in the observed heterogeneity in EEG mu rhythm in autism and typical development // Brain and Cognition. 2013. Vol. 82. P. 69-75.

Billeci L., Sicca F., Maharatna K. et al. On the application of quantitative EEG for characterizing autistic brain: a systematic review // Front. Hum. Neurosci. 2013. Vol. 7. № 442. doi: 10.3389/fnhum.2013.00442

Braadbaart L., Williams J.H.G., Waiter G.D. Do mirror neuron areas mediate mu rhythm suppression during imitation and action observation? // Int. J. Psychophysiol. 2013. Vol. 89. P. 99-105.

Dinstein I., *Thomas C., Humphreys K., Minshew N., Behrmann M., Heeger D.J.* Normal movement-selectivity in autism // Neuron. 2010. Vol. 66. № 3. P. 461-469.
Enticott P.G., Hoy K.E., Herring S.E. et al. Reduced motor facilitation during action observation in schizophrenia: a mirror neuron deficit? // Schizophr. Res. 2008. Vol. 102. № 1-3. P. 116-121.
Enticott P.G., Kennedy H.A., Rinehart N.J. et al. Mirror Neuron Activity Associated with Social Impairments but not Age in Autism Spectrum Disorder // Biol. Psych. 2012. Vol. 71. P. 427-433.
Fahim C., Stip E., Mancini-Marie A., Boualem M., Malaspina D., Beauregard M. Negative socio-emotional resonance in schizophrenia: a functional magnetic resonance imaging hypothesis // Medical Hypotheses. 2004. Vol. 63. P. 467-475.
Frith C.D., Corcoran R. Exploring 'theory of mind' in people with schizophrenia // Psychol. Medicine. 1996. Vol. 26. P. 521-530.
Gastaut H. Etude electrocorticographique de al reactive des rhythmes rolandique // Rev. Neurol. 1952. Vol. 87. P. 176-182.
Gastaut H.J., Bert J. EEG changes during cinematographic presentation; moving picture activation of the EEG // Electroencephalogr. and Clin. Neurophysiol. 1954. Vol. 6. P. 433-444.
Hamilton A.F.C. Reflecting on the mirror neuron system in autism: A systematic review of current theories // Dev. Cognitive Neurosc. 2013. Vol. 3. P. 91-105.
Hari R., Forss N., Avikainen S., Kirveskari E., Salenius S., Rizzolatti G. Activation of human primary motor cortex during action observation: a neuromagnetic study // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. P. 15061-15065.
Höller Y., Bergmann J., Kronbichler M. et al. Real movement vs. motor imagery in healthy subjects // Int. J. Psychophysiol. 2013. Vol. 87. P. 35-41.
Iacoboni M., Mazziotta J.C. Mirror neuron system: Basic findings and clinical applications // Ann. Neurol. 2007. Vol. 62. P. 213-218.
Kanner L. Early infantile autism // J. Pediat. 1944. Vol. 15. P. 211.
King B. H., Lord C. Is schizophrenia on the autism spectrum? // Brain Res. 2011. Vol. 1380. P. 34-41.
Lewin J., Kohen D., Mathew G. Handedness in mental handicap – investigation into populations of downs-syndrome, epilepsy and autism // Br. J. Psychiatry. 1993. Vol. 163. P. 674-676.
Marshall P.J., Meltzoff A.N. Exploring the EEG mu rhythm in human infancy // Dev. Cogn. Neurosci. 2011. Vol. 1. P. 110-123.
Martineau J., Cochin S., Magne R., Barthelemy C. Impaired cortical activation in autistic children: is the mirror neuron system involved? // Int. J. Psychophysiol. 2008. Vol. 68. P. 35-40.
Martineau J., Andersson F., Barthelemy C., Cottier J. H., Destrieux C. Atypical activation of the mirror neuron system during perception of hand motion in autism // Brain Res. 2010. Vol. 1320. P. 168-175.
Matson J.L., Rieske R.D., Tureck K. Fdditional considerations for the early detection and diagnosis of autism: review of available instruments // Res. in Autism Spectrum Disorders. 2011. Vol. 5. № 4. P. 1319-1326.
McCormick L.M., Brumm M.C., Beadle J.N., Paradiso S., Yamada Th., Andreasen N. Mirror neuron function, psychosis, and empathy in schizophrenia // Psychiatry Res. 2012. Vol. 201. № 3. P. 233-239.
Moran L.V., Hong L.E. High vs. Low frequency neural oscillations in schizophrenia // Schizophr. Bull. 2011. Vol. 37. № 4. P. 659-663.
Muthukumaraswamy S.D., Johnson B.W., McNair N.A. Mu rhythm modulation during observation of an object-directed grasp // Brain Res. Cognitive Brain Res. 2004. Vol. 19. P. 195-201.
Oberman L.M., Ramachandran V.S. Preliminary evidence for deficits in multisensory integration in autism spectrum disorders: The mirror neuron hypothesis // Social Neurosci. 2008. Vol. 3. № 3-4. P. 348-355.
Park I.H., Ku J., Lee H., Kim S.Y., Kim S.I., Yoon K.J., Kim J.J. Disrupted theory of mind network processing in response to idea of reference evocation in schizophrenia // Acta. Psych. Scandinavica. 2011. Vol. 123. P. 43-54.
Pfurtscheller G., Brunner C., Schlogl A., Lopes da Silva F.H. Mu rhythm (de)synchronization and EEG single-trial classification of different motor imagery tasks // NeuroImage. 2006. Vol. 31. P. 153-159.
Pineda J. The functional significance of mu rhythms: translating «seeing» and «hearing» into «doing» // Brain Res. Rev. 2005. Vol. 50. P. 57-68.
Pineda J.A., Allison B.Z., Vankov A. The effects of self-movement, observation, and imagination on mu rhythms and readiness potentials (RP's): toward a brain computer interface (BCI) // IEEE Transactions on Rehabilitation Engineering. 2000. Vol. 8. P. 219-222.

Rippon G., Brock J., Brawn C., Boucher J. Disorded connectivity in the autistic brain: Challenges for the «new psychophysiology» // Int. J. Psychophysiol. 2007. Vol. 63. P. 164-172.
Rizzolatti G., Craighero L. The mirror-neuron system // Annu. Rev. Neurosci. 2004. Vol. 27. P. 169-192.
Salmein R., Hari R. Spatiotemporal characteristics of sensorimotor neuromagnetic rhythms related to thumb movement // Neurosci. 1994. Vol. 60. P. 537-550.
Salvatore G., Dimaggio G., Lysaker P.H. An intersubjective perspective on negative symptoms of schizophrenia: implications of simulation theory // Cognitive Neuropsychiatry. 2007. Vol. 12. P. 144-164.
Schurmann M., Jarvelainen J., Avikainen S. et al. Manifest disease and motor cortex reactivity in twins discordant for schizophrenia // British J. Psychiatry. 2007. Vol. 191. P. 178-179.
Singh F., Pineda J., Cadenhead K.S. Association of impaired EEG mu wave suppression, negative symptoms and social functioning in biological motion processing in first episode of psychosis // Schizophr. Res. 2011. Vol. 130. № 1-3. P. 182-186.
Strelets V.B., Novototsky-Vlasov V.Y., Golikova J.V. Cortical connectivity in high frequency beta-rhythm in schizophrenics with positive and negative symptoms // Int. J. Psychophysiol. 2002. Vol. 44. P. 101-115.
Stroganova T.A., Nygren G., Tsetlin M.M. et al. Abnormal EEG lateralization in boys with autism // Clin. Neurophys. 2007. Vol. 118. P. 1842-1854.
Uhlhaas P. J., Singer W. Abnormal neural oscillations and synchrony in schizophrenia // Neurosci. Nature Rew. 2010. Vol. 11. P. 100-113.
Varcin K.J., Bailey P.E., Henry J.D. Empathic deficits in schizophrenia: the potential role of rapid facial mimicry // J. Internat. Neuropsychol. Soc. 2010. Vol. 16. P. 621-629.
Williams J.H.G. Self-other relations in social development and autism: multiple roles for mirror neurons and other brain bases // Autism Res. 2008. Vol. 1. P. 73-90.

Глава 2

НАРУШЕНИЯ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ И ИХ РЕГУЛЯЦИИ ПРИ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

Болезнь Альцгеймера – клиника, диагностика и лечение

С.И. Гаврилова

Содержание

1. Введение
2. Эволюция представлений о диагностике и систематике болезни Альцгеймера
3. Этиология
4. Диагностика
5. Параклинические диагностические методы
6. Клиника
7. Медикаментозная терапия болезни Альцгеймера

1. Введение

Болезнь Альцгеймера (первичная дегенеративная деменция альцгеймеровского типа) — наиболее распространенная форма первичных дегенеративных деменций позднего возраста с постепенным началом в пресенильном или старческом возрасте, неуклонным прогрессированием расстройств памяти и высших корковых функций вплоть до тотального распада интеллекта и психической деятельности в целом. Имеет характерный комплекс нейропатологических признаков.

Болезнь Альцгеймера (БА) – самая частая причина деменции в пожилом и старческом возрасте. По данным международных исследований, распространенность БА после 60 лет удваивается с каждым пятилетием, достигая 4,0% в возрасте 75 лет, 16,0% – в 85 лет и 32% – в 90 лет и старше. По данным клинико-эпидемиологического исследования репрезентативных групп пожилого населения Москвы, БА страдает 4,5% лиц в возрасте 60 лет и старше, причем повозрастные показатели заболеваемости растут по мере увеличения возраста обследованных: в возрастной группе 60–69 лет распространенность заболевания составляла 0,6%, в возрасте 70–79 лет – 3,6% и в возрасте 80 лет и старше – 15%, при этом, показатели частоты

Сокращения: АХ – ацетилхолин; АХЭ – ацетилхолинэстераза; БА – болезнь Альцгеймера; КТ – компьютерная томография; МРС – магнитно-резонансная спектроскопия; МРТ – магнитно-резонансная томография; НРФ – нейротрофические ростовые факторы; ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография; ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография; ApoE – аполипопротеин Е; NAA – N-ацетиласпартат; NGF – фактор роста нервной ткани; PSN – пресенилин; β-APP – белок предшественник амилоида.

БА среди пожилых женщин существенно выше по сравнению с мужчинами того же возраста (Гаврилова, Калын, 2002).

Обобщенные данные популяционных исследований, проведенных в Европе, свидетельствуют, что в возрасте 65 лет и старше показатели частоты (prevalence) деменции и БА составляют соответственно 6,4% и 4,4%. В США показатель частоты БА для лиц в возрасте 70 лет и старше составляет 9,7%. Общемировой показатель частоты деменции для населения 60 лет и старше равен 3,9%, а региональные показатели колеблются от 1,6% (для Африки) до 6,4% (для Северной Америки).

По данным Всемирной Организации Здравоохранения и Международной ассоциации обществ болезни Альцгеймера («Alzheimer's Disease International»), общее число больных в мире, страдающих деменцией, в 2013 году составило 44,5 млн человек, к 2030 году оно вырастет до 75,5 млн человек, а к 2050 году – до 135,5 млн человек, при этом на долю БА приходится от 50 до 70% пациентов.

Экстраполяция поло-возрастных показателей БА, установленных посредством популяционного исследования, проведенного на ограниченной территории России, на поло-возрастную структуру населения страны в целом позволила определить, что численность популяции больных БА составляет 1 млн 248 тыс. человек, по прогнозу она увеличится до 1 млн 354 тыс. к 2020 г. и составит 1% от общего населения России (Белоусов и др., 2009).

Диагностика, лечение и уход за больными с деменцией ложатся тяжелым экономическим бременем на государственный бюджет. Только прямые расходы на лечение и уход за больными в развитых странах достигают 38 тыс. долларов в расчете на одного больного в год, а общие затраты в мире на пациентов с деменцией ежегодно превышают 600 млд долларов (WHO..., 2010), а региональные расходы значительно превышают расходную часть бюджета многих стран.

Расходы на лечение и уход за больными с БА имеют тенденцию к неуклонному росту: в частности, в Великобритании в 2010 г. такие расходы составили около 20 млрд фунтов стерлингов, а к 2016 г. прогнозируется рост соответствующих финансовых затрат до 27 млрд фунтов стерлингов.

2. Эволюция представлений о диагностике и систематике болезни Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера была впервые описана А. Альцгеймером в 1906 г. (Alzheimer, 1907) как своеобразное заболевание коры головного мозга, начинающееся в пресенильном возрасте и сопровождающееся развитием тотальной деменции с выраженными нарушениями высших корковых функций (афато-апракто-агностическая деменция). А. Альцгеймер выделил свойственные этому заболеванию нейроморфологические изменения: сочетание сенильных бляшек и характерных изменений нейрофибрилл, позднее получивших название альцгеймеровских изменений нейрофибрилл. А. Альцгеймер в то время считал, что речь идет о новом заболевании, отличном от сенильной деменции. Однако позднее (Alzheimer, 1911) он высказал суждение о том, что

описанное им заболевание представляет собой атипичную форму сенильной деменции. С тех пор взгляды как отечественных, так и зарубежных исследователей на взаимоотношения между БА и сенильной деменцией неоднократно менялись. Большинство немецких психиатров первой половины XX века признавали эти заболевания в нозологическом плане различными. Такая же точка зрения преобладала в то время в англо-американской, французской и итальянской психиатрии. Позднее (60–80-е годы XX века) и в отечественной геронтопсихиатрии последовательно высказывалось мнение об относительной клинической самостоятельности упомянутых форм деменций позднего возраста, которое обосновывалось своеобразием их клинико-психопатологических проявлений и особенностей течения. Вопрос об их нозологической общности или самостоятельности отечественные ученые оставляли, однако, открытым ввиду отсутствия убедительных данных об общности или различиях их этиопатогенетических механизмов (Штернберг, 1967, 1977, 1983). Тем не менее, в разработанных в то время классификационных схемах, в том числе и в Международной классификации болезней 9-го пересмотра, указанные формы деменций диагностировались под различными названиями.

Начиная с конца 60-х – начала 70-х годов в зарубежной и особенно в англо-американской психиатрии стала преобладать тенденция к изменению содержания понятия БА и расширению ее диагностических границ за счет включения в эту нозологическую категорию значительной части случаев сенильной деменции. Основанием для такой трансформации взглядов послужило накопление нейроморфологических данных об общности гистопатологических признаков, выявляемых при нейропатологическом исследовании мозга умерших пациентов.

Это привело к тому, что в последние десятилетия традиционные представления о диагностических критериях и границах БА подверглись существенному пересмотру. В соответствии с диагностическими рекомендациями – NINCDS/ADRDA (McKhann et al., 1984), DSM-IV и CERAD (Mirra et al., 1993) и утвержденной Всемирной Организацией Здравоохранения Международной классификацией болезней 10-го пересмотра (International..., 1992), диагностическая рубрика «болезнь Альцгеймера» стала охватывать как относительно редкую форму пресенильной деменции, в целом соответствующую классическому описанию А. Альцгеймера, так и широко распространенную в населении старших возрастов сенильную деменцию альцгеймеровского типа.

Современная классификация БА основана на возрастном принципе. В соответствии с международной классификацией болезней и причин смерти 10-го пересмотра (1992 г.) выделяют следующие варианты БА:

1. Болезнь Альцгеймера с ранним (до 65 лет) началом (тип 2 болезни Альцгеймера, пресенильная деменция альцгеймеровского типа). Эта форма соответствует классической БА, и в литературе ее иногда обозначают как «чистая» БА.

2. Болезнь Альцгеймера с поздним (после 65 лет) началом (тип 1 болезни Альцгеймера, сенильная деменция альцгеймеровского типа).

3. Атипичная болезнь Альцгеймера.

Основные клинические формы заболевания различаются не только по возрасту больных к началу заболевания (тем более что возраст появления первых симптомов

бывает часто невозможно точно установить), но имеют существенные различия в клинической картине и особенностях прогрессирования заболевания.

Атипичная БА, или деменция смешанного типа, характеризуется сочетанием клинических и нейроморфологических признаков, характерных для БА и деменции иного генеза (сосудистой деменции, болезни Паркинсона, деменции с тельцами Леви).

3. Этиология

Генетически обусловленные («семейные») формы БА составляют не более 10% случаев заболевания. Выявлены три гена, ответственные за их развитие. На хромосоме 21 расположен ген амилоидного предшественника (β-APP); на хромосоме 14 – пресенилин-1 (PSN-1) и на хромосоме 1 – пресенилин-2 (PSN-2).

Мутации в гене β-APP ответственны за 3–5% случаев всех пресенильных семейных форм болезни Альцгеймера (наследование происходит по аутосомно-доминантному типу), мутации в гене PSN-1 – выявляются в 60–70% (для мутаций в этом гене характерна полная пенетрантность, заболевание обязательно проявляется в возрасте от 30 до 50 лет). Мутации в гене PSN-2 выявляются чрезвычайно редко, и они обусловливают развитие как ранних, так и поздних семейных форм болезни (для них характерна неполная пенетрантность).

Роль мутаций, или полиморфизмов, генов пресенилинов при развитии спорадических случаев поздней БА (сенильной деменции альцгеймеровского типа) пока остается недостаточно выясненной. Выявленный недавно ε_4-изоморфный вариант гена аполипопротеина Е (ApoE4) в настоящее время считают основным генетическим фактором риска развития БА.

4. Диагностика

В соответствии с диагностическими рекомендациями, разработанными международными экспертными группами NINCDS/ADRDA, DSM-IV, CERAD, и в соответствии с утвержденной ВОЗ и принятой в РФ Международной классификацией болезней десятого пересмотра, прижизненный диагноз болезни Альцгеймера основан на присутствии следующих облигатных признаков:

• наличие синдрома деменции;

• множественный прогрессирующий дефицит познавательных (когнитивных) функций, т.е. сочетание расстройств памяти и признаков, по крайней мере, одного из следующих когнитивных нарушений: афазии (нарушение речевой функции), апраксии (нарушение способности к выполнению двигательной активности, несмотря на сохранные двигательные функции), агнозии (невозможность распознавать или идентифицировать объекты, несмотря на сохранное чувственное восприятие), нарушения собственно интеллектуальной деятельности (ее планирования и программирования, абстрагирования, установления причинно-следственных связей и др.);

• снижение социальной или профессиональной адаптации больного по сравнению с ее прежним уровнем вследствие нарушения памяти и когнитивных функций;

• малозаметное начало и неуклонное прогрессирование заболевания;

• при клиническом исследовании исключены другие заболевания центральной нервной системы (например, заболевания сосудов головного мозга, болезнь Паркинсона или Пика, хорея Гентингтона, субдуральная гематома, нормотензивная гидроцефалия и др.) или иные заболевания, которые могут вызывать синдром так называемой вторичной деменции (например, гипотиреоз, недостаточность витамина B_{12} или фолиевой кислоты, гиперкальциемия, нейросифилис, ВИЧ-инфекция, тяжелая органная патология и др.), а также интоксикация, в том числе медикаментозная;

• признаки вышеперечисленных когнитивных нарушений присутствуют вне состояний помрачения сознания;

• анамнестические сведения и данные клинического исследования исключают связь расстройств когнитивных функций с каким-либо другим психическим заболеванием (например, с депрессией, шизофренией, умственной отсталостью и др.).

Применение перечисленных диагностических критериев позволило повысить точность прижизненной клинической диагностики БА до 90–95%, однако достоверное подтверждение диагноза возможно только с помощью данных нейроморфологического (как правило, посмертного) исследования головного мозга.

Необходимо подчеркнуть, что достоверная объективная информация о развитии заболевания играет часто более важную роль в диагностике БА по сравнению с многочисленными лабораторными и/или инструментальными методами исследования, поскольку ни одно из прижизненных параклинических исследований, в том числе и данные КТ/МРТ-исследования, не обладают высокой специфичностью и несомненной диагностической значимостью.

В последние годы происходит новая ревизия диагностических границ БА (см. сл. раздел).

5. Параклинические диагностические методы

Из инструментальных методов для диагностики БА наиболее широко используют компьютерную томографию (КТ) и магнитно-резонансную томографию (МРТ). Они входят в диагностический стандарт при обследовании больных, страдающих деменцией, так как позволяют выявить заболевания или повреждения головного мозга, которые могут быть причиной ее развития.

К диагностическим КТ/МРТ-признакам, подтверждающим диагноз деменции альцгеймеровского типа, относят диффузную (лобно-височно-теменную или на ранних этапах – височно-теменную) атрофию (уменьшение объема) вещества головного мозга. При сенильной деменции альцгеймеровского типа также может выявляться поражение белого вещества головного мозга в перивентрикулярной зоне и области полувальных центров.

К диагностически значимым линейным КТ/МРТ-признакам, позволяющим отграничить БА от возрастных изменений, относятся: увеличенное по сравнению с

возрастной нормой межкрючковое расстояние; расширение перигиппокампальных щелей; уменьшение объема гиппокампа — один из ранних диагностических признаков БА. Наиболее важные для ранней диагностики БА данные получены при исследовании метаболических процессов в головном мозге. Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) – радиоизотопный метод исследования, позволяющий, в частности, определить уровень метаболизма глюкозы в головном мозге. Установлено, что снижение метаболизма глюкозы в теменно-височных областях мозга является ранним диагностическим признаком БА, хотя чувствительность и специфичность метода значительно выше на стадии умеренной и тяжелой деменции. Протонная магнитно-резонансная спектроскопия (МРС) позволяет определять содержание различных метаболитов, в частности, N-acetylaspartate (NAA) – маркера нейрональной функции. При БА наблюдается снижение уровня NAA в задних отделах поясной извилины, в которых наиболее рано происходит утрата нейронов, что может быть использовано в качестве раннего диагностического признака. Другим нейроинтраскопическим параметром, значительно изменяющимся при БА, является мозговой кровоток, исследование которого проводится методами однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) и перфузионной МРТ.

Билатеральное уменьшение кровотока в височно-теменных отделах коры (по данным ОФЭКТ) и атрофия височных долей (по данным КТ и ОФЭКТ) признаются диагностически значимыми функциональными характеристиками мозговых структур при БА. В настоящее время все методы нейровизуализации, кроме структурных МРТ и КТ, малодоступны и используются в основном для исследовательских целей.

Электроэнцефалографическое исследование (ЭЭГ)*:* патологические изменения ЭЭГ при деменциях альцгеймеровского типа отмечаются у большинства больных. Наиболее типичны: нарастание медленноволновой активности, преимущественно ее тета-диапазона, чаще низкой или средней амплитуды, и дельта-активности, а также редукция альфа-ритма в виде снижения его амплитуды и сглаженности региональных различий по сравнению с возрастной нормой. Выраженность бета-активности, как правило, также снижена. Довольно часто (у трети больных) наблюдаются генерализованные билатерально-синхронные тета- и дельта-волны, превышающие по амплитуде основную активность (Пономарева и др., 1991).

Нейроморфология болезни Альцгеймера, к настоящему времени детально изученная, характеризуется рядом типичных признаков, к числу которых относятся следующие: атрофия вещества головного мозга, утрата нейронов и синапсов, грануловакуолярная дегенерация, глиоз, сенильные (нейритические) бляшки и нейрофибрилярные клубки, а также амилоидная ангиопатия. Однако только два из них – сенильные бляшки и нейрофибриллярные клубки, рассматриваются как ключевые нейроморфологические феномены заболевания и имеют диагностическое значение.

В соответствии с диагностическими указаниями, разработанными международной группой экспертов (Mirra et al., 1993), патоморфологический диагноз деменции альцгеймеровского типа (болезни Альцгеймера) postmortem основывается на количественной оценке сенильных (нейритических) бляшек и нейрофибриллярных

клубков, минимальное число которых в неокортексе и/или гиппокампе, необходимое для подтверждения диагноза, варьирует в зависимости от возраста больного к моменту смерти. Например, численность сенильных (нейритических) бляшек (при одновременном присутствии и нейрофибриллярных клубков) в любом из регионов неокортекса должна составлять в возрасте до 50 лет не менее 2–5/мм^2, в 50–65 лет – 8/мм^2; в 66–75 лет – >10/мм^2; и для лиц старше 75 лет – >15/мм^2. Введение указанных количественных параметров для установления облигатных (основных) диагностических патоморфологических признаков БА обусловлено тем, что сходные нейроморфологические изменения могут обнаруживаться не только при деменции альцгеймеровского типа, но и у пожилых людей, не имевших признаков деменции, а также при некоторых других формах патологии головного мозга.

6. Клиника

В течении болезни традиционно выделяются 3 основные стадии: начальная, которая в свою очередь подразделяется на этапы доклинических проявлений и мягкой деменции, а также стадии умеренной и тяжелой деменции.

Начальная стадия характеризуется начальными признаками мнестико-интеллектуального снижения. На ***преклиническом этапе*** (так называемая сомнительная деменция (question able dementia) по (Berg et al., 1993), или «симптоматическая» стадия БА по NIA критериям БА (Jack et al., 2011))* обнаруживается только постоянная легкая забывчивость, неполное воспроизведение событий, небольшие затруднения в определении временных взаимоотношений и в мыслительных операциях (например, в определении сходства–различия). Отмечается также незначительное ухудшение в социальной и профессиональной деятельности при полной сохранности повседневных видов активности (возможно только снижение интеллектуальных интересов). Уже на этом этапе появляются легкие дисфазические нарушения либо элементы нарушений праксиса, личностные изменения по типу акцентуации или нивелировки личностных особенностей, а также снижение психической активности. На этом наиболее раннем этапе развития заболевания больным, как правило, удается скрывать или компенсировать имеющиеся у них расстройства.

На этой стадии ***«мягкой» деменции*** (mild dementia) нарушения памяти становятся более отчетливыми (особенно на текущие события), появляются трудности в хронологической, а также в географической ориентировке. Возникают явные затруднения в мыслительных операциях, при этом особенно страдает абстрактное мышление, возможности обобщения, суждения, сравнения.

Постепенное нарастание нарушений памяти и других симптомов когнитивного снижения является общей закономерностью развития деменции альцгеймеровского типа. Уже на этой ранней стадии расстройства памяти сочетаются с личностными изменениями по типу так называемой трансиндивидуальной (сенильной) перестройки структуры личности, реже сопровождаются резким, иногда гротескным

* см. следующий раздел.

заострением характерологических особенностей. Лишь в исключительно редких случаях с самого начала болезни отчетливо выступают признаки снижения психической активности и аспонтанности.

На фоне личностных изменений нередко развивается склонность к бредообразованию. Более чем у половины больных обнаруживаются эпизодические, как правило, мало разработанные и несистематизированные бредовые идеи, чаще в форме мелочного конкретного бреда воровства, ущерба, мелкого притеснения, который обычно бывает направлен против лиц из ближайшего окружения больных. Аффективные расстройства на раннем этапе болезни чаще всего представлены субдепрессивными реакциями, возникающими как реакция на собственную несостоятельность или при актуализации бредовых идей ущерба.

На стадии ***умеренно выраженной деменции*** (moderate dementia) клиническую картину болезни определяет синдром амнестического слабоумия, который характеризуется прогрессирующим распадом всех сторон психической деятельности. Его ядром является амнестический синдром, достигающий на этом этапе значительной тяжести. Становятся все более выраженными проявления фиксационной амнезии. Заучивание какой-либо новой информации делается невозможным. Больные практически утрачивают способность к воспроизведению хронологии автобиографических или основных общественно-исторических событий и даже их последовательности. Они уже не могут ориентироваться во времени, а часто и в окружающей обстановке. Постепенно воспоминания о прошлом становятся все более неполными и неточными, распадается и запас приобретенных знаний. Этот распад следует закономерностям прогрессирующей амнезии: запасы памяти и знаний утрачиваются в последовательности, обратной их приобретению в течение жизни. Наиболее долго сохраняются рано приобретенные и наиболее упроченные знания.

По мере углубления деменции у больных развивается картина амнестической дезориентировки, нередко в сопровождении феномена «сдвига ситуации в прошлое», т.е. амнестической дезориентировки с патологическим оживлением воспоминаний о далеком прошлом и ложными узнаваниями окружающих, которых больные принимают за лиц из своей прошлой жизни. «Сдвиг в прошлое» распространяется в дальнейшем и на представления о собственной личности: например, больные называют свой возраст, свое семейное положение и род занятий соответственно тому периоду своего прошлого, в котором они в этот момент как бы «живут». Максимальным выражением такого рода расстройств является так называемый старческий, или ложный, делирий (Жислин, 1965), сопровождающийся повышенной активностью больных, непродуктивной «деловитостью», постоянным стремлением к псевдодеятельности. При этом больные, как правило, неизменно сохраняют благодушный аффект, живость и разговорчивость.

На этапе умеренной деменции отчетливо выявляются ***нарушения высших корковых функций***: признаки амнестической афазии, лицевая дисгнозия, нарушения мнестического компонента праксиса (утрата последовательности выполнения отдельных элементов привычной деятельности), а в части случаев – и признаки конструктивной апраксии. У пациентов с сенильным типом заболевания в отличие от пресенильной БА долго сохраняется темп, живость и выразительность речи, повы-

шенная речевая готовность, а также наблюдается длительная сохранность моторного компонента праксиса.

На стадии ***тяжелой деменции*** (severe dementia) состояние больных характеризуется тотальной деменцией с глубоким распадом памяти, полной фиксационной амнезией и амнестической дезориентировкой, близкой к тотальной. Больные полностью утрачивают представления о времени и окружающей обстановке и имеют крайне скудные представления о собственной личности. Распад интеллектуальных функций достигает такой тяжести, что способность больных к суждениям и умозаключениям практически полностью утрачивается. Они не в состоянии разрешать какие-либо житейские проблемы и утрачивают возможность независимого существования. Нарушения речи, гнозиса и праксиса достигают (особенно при пресенильном типе болезни) степени тяжелого распада соответствующих функций.

По мере углубления слабоумия у больных все виды восприятия ими окружающего мира становятся фрагментарными, они не могут интегрироваться в единое целое, чему способствует также слабость их активного внимания, рассеянность и отвлекаемость. Внешние раздражители вызывают только наиболее автоматизированные, шаблонные формы реагирования. Типичным примером такого поведения являются так называемые «мнимые беседы» между больными, в которых сохраняется только внешняя ситуация беседы при полной бессмысленности ее содержания. Настроение больных становится все более отчетливо беспечным или эйфоричным, а в дальнейшем у них наступает полное эмоциональное опустошение. У части больных, напротив, преобладает гневливость, злобность, агрессивность.

На этом этапе болезни все больше нарастает регресс поведения: больные становятся прожорливыми, неряшливыми и неопрятными, а позднее – совершенно беспомощными. Часто наблюдается извращение ритма сон–бодрствование. Ночной сон делается поверхностным, прерывистым, а днем больные обычно дремлют. Одновременно учащаются эпизоды ночного двигательного беспокойства и спутанности с суетливостью и типичными «сборами в дорогу». Бредовые высказывания и конфабуляторная продукция на этом этапе постепенно оскудевают, становятся фрагментарными, а затем исчезают и полностью амнезируются больными.

На стадии тяжелой деменции у большинства больных обнаруживаются выраженные нарушения высших корковых функций, характер и тяжесть которых во многом определяются типом БА.

На стадии тяжелой деменции ***неврологическая симптоматика***, появляющаяся уже на более ранних этапах болезни, достигает наибольшей выраженности. При сенильном типе заболевания она представлена подкорковыми нарушениями, обычно в виде так называемого сенильного тремора и «старческих» изменений походки (последняя становится семенящей и шаркающей). Но даже на этапе исходного состояния при сенильной деменции не наблюдается тех грубых неврологических расстройств (хватательные и оральные автоматизмы, амиостатические синдромы или гиперкинезы), которые характерны для конечного этапа пресенильной БА.

На заключительном этапе тяжелого слабоумия (***конечное или исходное состояние***) разрушается вся психическая деятельность больных. Распад достигает такой степени, какая очень редко встречается при других дегенеративных процес-

сах, например, при болезни Пика или хорее Гентингтона (Штернберг, 1967). На конечном этапе болезни появляются такие тяжелые неврологические расстройства, как развитие вынужденной («эмбриональной») позы, контрактур, множественные насильственные двигательные феномены, автоматизмы и примитивные рефлексы, насильственные гримасы плача и смеха, нередко – эпилептические припадки. Одновременно, как правило, развиваются выраженные общесоматические изменения: похудание, доходящее до кахексии, крайнее одряхление, булимия, трофические нарушения (пролежни), эндокринные расстройства (например маскулинизация у женщин), вслед за которыми наступает смерть.

Клиническая феноменология БА на всех этапах ее развития имеет существенные особенности, зависящие от клинического типа заболевания (пресенильного или сенильного). Основные признаки, дифференцирующие клинические типы БА приведены в таблице.

Таблица

Параметры, применяемые в дифференциации основных клинических форм болезни Альцгеймера. Цит. по (Гаврилова, 1999)

Пресенильный тип болезни Альцгеймера (синоним: пресенильная деменция альцгеймеровского типа)	**Сенильный тип болезни Альцгеймера** (синоним: сенильная деменция альцгеймеровского типа)
Начало преимущественно в пресенильном возрасте	Начало преимущественно в старческом возрасте
Медленное развитие болезни на инициальном этапе и быстрое прогрессирование на этапе клинически выраженной деменции	Менее прогредиентное развитие болезни на всех этапах ее течения, за исключением конечного
Появление корковых дисфункций уже на ранних этапах болезни	Нарушение высших корковых функций на этапе далеко зашедшей деменции
Множественное тяжелое поражение высших корковых функций на этапе тяжелой деменции, вплоть до «неврологизации» расстройств	Общее ухудшение высших корковых функций, которое редко достигает степени явных очаговых расстройств
Длительная сохранность реакции пациента на болезнь и основных его личностных особенностей	Выраженные изменения личности и утрата критики к болезни уже на ранних ее этапах
Относительно гомогенная клиническая картина на развернутом этапе деменции (афато-апрактоагностическая деменция)	Гетерогенная клиническая картина (различные клинические формы) деменции

7. Медикаментозная терапия болезни Альцгеймера

Современная патогенетическая терапия БА предусматривает сочетание компенсаторной (холинергической или глутаматергической) и нейропротективной (нейротрофической) методики медикаментозного воздействия.

Основные направления в фармакотерапии БА традиционно основывались на доказательствах холинергической недостаточности, развивающейся в связи с прогрессирующей дегенерацией холинергических нейронов уже на ранних этапах развития болезни. Доказано, что дефицит нейромедиатора ацетилхолина (АХ) лежит в

основе проявлений когнитивной недостаточности и последующего формирования тотальной деменции. На основе этих данных были разработаны предпосылки ***холинергического направления терапии БА***. Выраженность холинергических нарушений коррелирует со степенью деменции, гибелью нейронов, а также с числом сенильных бляшек и нейрофибриллярных клубков – основных морфологических признаков БА. При БА утрачивается от 30 до 95% холинергических нейронов, особенно в коре и гиппокампе. В настоящее время для преодоления холинергической недостаточности используются главным образом ингибиторы ацетилхолинэстеразы (АХЭ). Наибольшую распространенность в последнее время приобрели ингибиторы АХЭ второго поколения: *ривастигмин (экселон), галантамин (реминил) и донепезил (арисепт)*. Терапевтические эффекты этих препаратов, так же как и безопасность их применения у больных с мягкой–умеренной деменцией, обусловленной БА, были убедительно показаны в многочисленных отечественных и зарубежных клинических исследованиях.

Имеются также ограниченные доказательства эффективности ингибитора АХЭ первого поколения – ипидакрина (амиридин, аксамон).

Получены убедительные доказательства вовлечения в нейродегенеративный патологический процесс, лежащий в основе деменции альцгеймеровского типа, не только холинергической, но также и других нейротрансмиттерных систем, и в первую очередь – ***глутаматергической***. Установлено, что при БА существенно снижено число глутаматных рецепторов в области гиппокампа – ключевой зоне развития нейродегенерации альцгеймеровского типа, причем уровень снижения достоверно коррелирует с тяжестью деменции. Разработана концепция глутаматопосредованной эксайтотоксичности и получены экспериментальные и нейропатологические данные, подтверждающие участие этого механизма в процессе нейродегенерации альцгеймеровского типа. Нейродегенерация, происходящая по механизму так называемой медленной («метаболической») эксайтотоксичности, развивается при нормальном содержании кальция, но в условиях снижения энергетического состояния клетки, а роль пускового механизма в этом случае играет нарушение АТФ-производящей функции митохондрий. Следствием этого процесса является снижение активности АТФ-зависимых ферментов, и в частности Na^+/K^+-АТФаз, которые выполняют функцию поддерживания мембранного потенциала клетки. Нарушение этой функции даже при нормальной концентрации и активности возбуждающих аминокислот влечет за собой медленную деполяризацию клетки, что приводит к снятию магниевого блока у NMDA-рецепторов. Вслед за этим ионы кальция массированно проникают в нейроны, чем запускается каскад внутриклеточных нейродегенеративных реакций. Представленные выше данные позволяют считать глутамат и NMDA-рецепторы важными факторами, участвующими в патогенезе БА. В связи с этим применение высоко эффективных средств для лечения БА на основе лигандов глутаматергической системы стало в настоящее время одним из ведущих направлений в фармакотерапии БА.

Мемантин – активное вещество препарата акатинол мемантин является неконкурентным низкоаффинным антагонистом NMDA-рецепторов. Он позволяет фи-

зиологически активировать NMDA-рецепторы в процессе нейрональной передачи сигнала и одновременно блокирует обусловленную нейродегенеративным процессом патологическую активацию NMDA-рецепторов. Акатинол мемантин, применяемый на стадии мягкой и умеренной деменции, обеспечивает симптоматическое улучшение когнитивных функций, за счет того, что блокирует патологическую активацию NMDA-рецепторов и снижает «шум», обусловленный длительной повышенной концентрацией глутамата или гиперактивацией NMDA-рецепторов и связанным с этими процессами патологическим притоком кальция в постсинаптические нейроны. При применении на стадии умеренно тяжелой и тяжелой деменции акатинол мемантин способен вызывать позитивный симптоматический эффект на уровне еще сохранившихся глутаматергических синапсов, что способствует поддержанию повседневной активности пациента.

На основе полученных в последнее десятилетие доказательств вовлечения в патогенез первичных нейродегенеративных заболеваний, и в первую очередь – БА, дефицита нейротрофических ростовых факторов (НРФ) разработана ***нейропротективная (нейротрофическая)*** стратегия терапии. Поскольку было установлено, что фактор роста нервной ткани (NGF) и некоторые другие НРФ препятствуют развитию нейроапоптоза, введение нейротрофинов было признано значимым направлением нейропротективной (нейротрофической) терапии БА, способной, с одной стороны, сохранять дегенерирующие холинергические нейроны, а с другой – усиливать функции еще сохранных нейронов. Открытие нейротрофических эффектов *церебролизина*, сходных с активностью NGF, вызвало новый интерес к этому препарату. Церебролизин способен редуцировать процесс аномального амилоидогенеза, препятствовать активации клеток нейроглии и продукции воспалительных цитокинов, тормозить процесс нейроапоптоза, стимулировать производство стволовых клеток – предшественников нейронов, а также рост дендритов и формирование синапсов и таким образом препятствовать реализации различных патогенетических механизмов, ведущих к нейродегенерации и нейрональной гибели при БА (Rockenstein et al., 2000). Достоверные симптоматические эффекты курсовой терапии церебролизином при лечении БА, так же как и безопасность его применения в высоких суточных дозах (20–30 мл в 100 мл физиологического раствора хлорида натрия по 20 в/в инфузий на курс), к настоящему времени доказана в ряде клинических плацебо-контролируемых исследований (Ruther et al., 1994; Гаврилова, 2007; Reiner et al., 1997).

Получены также доказательства болезнь-модифицирующего эффекта церебролизина при применении повторных курсов терапии по указанной выше методике в течение длительного времени (Гаврилова, 2007). Долговременная курсовая терапия церебролизином позволяет замедлить течение нейродегенеративного процесса не только на стадии мягкой, но даже на этапе умеренной деменции. Применение церебролизина не рекомендуется при наличии судорожной активности, психотических расстройств, а также на стадии тяжелой деменции.

Литература

Белоусов Ю.Б., Зырянов С.К., Белоусов Д.Ю., Бекетов А.С. Клинико-экономические аспекты терапии болезни Альцгеймера в России. // Качественная клиническая практика. Спецвыпуск. Болезнь Альцгеймера. 2009. С. 28.

Гаврилова С.И. Фармакотерапия болезни Альцгеймера. М.: Пульс, 2007. 359 с.

Гаврилова С.И., Калын Я.Б. Социально-средовые факторы и состояние психического здоровья пожилого населения // Вестник РАМН. 2002. № 9. С. 15-20.

Жислин С.Г. Органические синдромы позднего возраста (амнестический синдром, старческий делирий) // Очерки клинической психиатрии. М., 1965. С. 166-180.

Пономарева Н.В., Селезнева Н.Д., Колыхалов И.В. Нейрофизиологические механизмы деятельности мозга при болезни Альцгеймера // Вопросы геронтопсихиатрии. М., 1991. С. 58-66.

Штернберг Э.Я. Клиника деменций пресенильного возраста. М.: Медицина, 1967. 247 с.

Штернберг Э.Я. Геронтологическая психиатрия. М.: Медицина, 1977. 205 с.

Штернберг Э.Я. Психические расстройства при атрофических процессах головного мозга // Руководство по психиатрии. Ред. А.В. Снежневский. М.: Медицина, 1983. Т. 2. С. 49-71.

Alzheimer A. A pecuilar disease of the cerebral cortex (National Library of Medicine trans.) // Allgemein Zeitschrift Psychiatr. 1907. Vol. 64. P. 146-158.

Alzheimer A. Über Eigenartige Krankheitsfalle des Spaten Altors // Z. Neurol. 1911. Bd 4. S. 356-385.

Berg L., McKee D.W., Miller J.P. et al. Neuropathological indices of Alzheimer's disease in demented and nondemented persons aged 80 years and older // Arch. Neurol. 1993. Vol. 50. P. 34-358.

International Statistical Classification of Diseases, 10th revision ICD-10. World Health Organisation: Geneva, 1992.

Jack C.R.Yr., Albert M., Knopman D.S. et al. Introduction to revised criteria for diagnosis of Alzheimer`s disease: National Institute on Aging and the Alzheimer Association Workgroups // Alzheimer`s Dement. 2011. Vol.7. № 3. P. 257-262.

McKhann G., Drachman D., Folstein M. et al. Clinical diagnosis of Alzheimer`s disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer`s disease // Neurology. 1984. Vol. 146. P. 939-944.

Mirra S.S., Hart M.N., Terry R.D. Making the diagnosis of Alzheimer's disease: a primer for practicing pathologists // Arch. Pathol. Lab. Med. 1993. Vol. 117. P. 132-144.

Rockenstein E., Mallory M., Mante M. et al. Effects of cerebrolysin in human APP transgenic animal models of Alzheimer disease // Neurobiol. Aging. 2000. Vol. 21. P. 168.

Rutter E., Ritter R., Apecechea M. et al. Efficacy of the peptidergic nootropic drug cerebrolysin in patients with senile dementia of the Alzheimer type // Parmacopsychiatry. 1994. Vol. 27. № 1. P. 32-40.

WHO, Alzheimer's Disease International, World Alzheimer's Report. 2010.

Ранняя диагностика болезни Альцгеймера на додементной стадии и превентивная терапия

С.И. Гаврилова, Н.Д. Селезнева, И.Ф. Рощина, Я.Б. Федорова

Содержание

1. Введение
2. Психопатологические и нейропсихологические подходы в разработке методов диагностики БА на додементном этапе ее развития
3. Прогностическая значимость синдрома «мягкого когнитивного снижения» по данным длительного комплексного исследования
4. Прогностическая значимость нейропсихологического подхода для доклинической диагностики БА
5. Выводы
6. Превентивные терапевтические подходы: отечественный опыт

1. Введение

Болезнь Альцгеймера (БА), впервые описанная в 1906 г. Алоисом Альцгеймером как редкая форма пресенильной деменции со специфическим стереотипом развития и набором нейропатологических признаков, в настоящее время является наиболее частым и дорогостоящим заболеванием, приводящим к инвалидизации больных. По этим медицинским и социально-экономическим показателям в ближайшие годы ожидается экспоненциальный рост в связи демографическими процессами, т.е. увеличением продожительности жизни и числа больных с деменцией, которые наблюдаются не только в экономически развитых, но и в развивающихся странах.

По прогнозу экспертов (Alzheimer Disease International..., 2011), число людей с деменцией в мире возрастет с 36 млн в 2010 г. до 66 млн в 2030 г. и до 115 млн – к 2050 г. Это означает, что в ближайшие 30-40 лет почти каждый человек в течение своей жизни окажется жертвой деменции либо как пациент, либо как лицо, которое вынуждено ухаживать за дементным больным. Наибольший рост заболеваемости ожидается в так называемых странах с низким и средним доходом, к последним можно причислить и Россию. Прогнозируется, что доля больных с деменцией в этих странах вырастет с 58 до 71% от мировой популяции пациентов, страдающих слабоумием (Гаврилова, 2003).

Несмотря на огромные усилия мирового научного и медицинского сообщества за 30-летний период активных научных исследований в области нейробиологии и нейрофармакологии БА, так и не удалось разработать метода лечения, способного не только уменьшить тяжесть клинических симптомов болезни, но и достоверно

Сокращения: БА – Болезнь Альцгеймера; НЕП – неприлизин.

модифицировать ее течение, т.е. остановить или явно замедлить ее прогрессирование. Одной из главных причин более чем скромных достижений в лечении БА, по мнению специалистов в этой области, является позднее начало терапевтического вмешательства, ибо диагноз БА впервые ставится и соответственно лечение начинается только тогда, когда у пациента диагностируется синдром деменции. Формирование же последнего свидетельствует о выраженности и распространенности процесса нейродегенерации и истощении компенсаторных резервов мозга. Поэтому сегодня со всей остротой встает вопрос о необходимости диагностики БА на ранней, т.е. додементной или даже еще более ранней – досимптомной, стадии развития нейродегенеративного заболевания. Продолжительность додементного этапа БА, по оценке специалистов, может составлять не менее 10–15 лет.

Не менее актуальная задача – поиск эффективных методов фармакологического вмешательства, способных остановить или существенно замедлить начавшееся развитие нейродегенеративного процесса и тем самым предотвратить или отложить на ряд лет формирование слабоумия. Без решения именно этой задачи «сверхранняя» диагностика БА или другого прогрессирующего нейродегенеративного заболевания, приводящего к развитию деменции, становится чисто схоластическим действием, которое не способно не только оказать помощь больному, но может даже нанести ему существенный вред, став причиной хронического психологического стресса и депрессии, что само по себе является фактором риска развития БА.

Очень важным направлением научных исследований последнего пятилетия стала разработка критериев диагностики БА на додементной стадии ее развития. С этой целью в США создавались специальные рабочие группы под эгидой Национального института старения и Американской альцгеймеровской ассоциации (NIA-AA) с участием специалистов из Великобритании и Франции.

По результатам деятельности этих рабочих групп были опубликованы «Диагностические рекомендации NIA-AA», которые включают два раздела: первый состоит из набора клинических критериев, которые могут использоваться в практическом здравоохранении и не требуют высокотехнологичных нейровизуализационных исследований или анализа ликвора пациентов. Второй – представляет собой набор исследовательских критериев для использования в научно-исследовательских учреждениях и в клинических испытаниях (Jack et al., 2010). Этот второй набор критериев NIA-AA предназначен для диагностики БА на додементном этапе ее развития, клинически соответствующем синдрому мягкого когнитивного снижения (Mild cognitive impairment – MCI). Этот исследовательский набор включает использование биомаркеров, основанных на нейровизуализационных данных или исследование состава ликвора. Он имеет 4 уровня определенности, зависящие от присутствия и природы биомаркеров БА.

По заключению разработчиков, необходима дальнейшая значительная работа по валидизации критериев, использующих биомаркеры, и по стандартизации биомаркерного анализа, прежде чем их можно будет использовать в службах оказания помощи пациентам. По мнению авторов, в дальнейшем некоторые аспекты исследовательских критериев могут потребовать пересмотра. Предполагается, что такая работа будет проводиться регулярно по мере появления новой информации.

В исследовательских рекомендациях NIA-AA используется термин «MCI вследствие БА», который соответствует синдрому MCI амнестического типа и может рассматриваться как симптоматическая додементная фаза БА. В рекомендациях подчеркивается, что, аналогично тому, как диагностируется альцгеймеровская деменция, «MCI вследствие БА» не может быть определена только с помощью лабораторных тестов, а требует заключения клинициста. Другими словами, MCI рассматривается как синдром, определяемый клиническими, когнитивными и функциональными критериями (Jack et al., 2011).

Современные «Диагностические критерии NIA-AA» существенно отличаются от использовавшихся для диагностики БА более четверти века «Критериев NINCDS-ADRDA» (McKhann et al., 1984). В новые критерии введена формализация диагностических критериев не только для деменции, обусловленной БА, но и для двух додементных стадий: для наиболее ранней – асимптоматической, и ранней симптоматической (последняя соответствует диагнозу MCI вследствие БА). В соответствии с «критериями NIA-AA», диагноз БА может быть поставлен еще до того, как сформировался синдром деменции, на основании сочетания амнестического синдрома гиппокампального (амнестического) типа и специфических биомаркеров. К последним относятся биомаркеры, отражающие накопление β-амилоида в мозге больных, о чем свидетельствует снижение содержания амилоида β-42 в ликворе и/или накопление амилоидного трейсера по данным PIB PET, и биомаркеры, подтверждающие наличие нейрональной дегенерации: повышение в ликворе содержания тау-белка (общего и фосфорилированного), снижение метаболизма глюкозы в височно-теменной коре по данным FDG PET, а также наличие атрофии вещества мозга в височно-теменных структурах и гиппокампе.

Был определен уровень диагностической значимости как показателей PET с амилоидным лигандом (PIB PET), так и для биомаркеров, содержащихся в ликворе (Ruether et al., 2001). К маркерам высокой диагностической значимости, т.е. с большой вероятностью прогнозирующих развитие у больных с синдромом MCI амнестического типа в ближайшие 5 лет деменции, обусловленной БА, относят наличие в ликворе обоих биомаркеров: амилоидоза (CSFAβ) и нейронального повреждения (CSFtau/ptau); к маркерам промежуточной значимости относят наличие в ликворе одного из биомаркеров БА: Aβ и τ/pτ.

Следует отметить, что биомаркеры как церебрального амилоидоза, так и нейрональной дегенерации встречаются и при других церебральных заболеваниях. Существенным недостатком рассматриваемых диагностических критериев является отсутствие стандартизированных показателей для каждого из биомаркеров.

Значимость предложенных критериев ранней (додементной) диагностики БА была изучена в пятилетнем «когортном» исследовании, проведенном С.Г.Б. Восом с соавторами (Vos et al., 2013). Большая когорта, состоящая из 227 пожилых участников (ср. возраст 72,9 + 6,0), 55% из которых составляли женщины, были оценены с использованием шкалы MMSE и батареи когнитивных тестов и исследованы на ликворные биомаркеры БА. В соответствии с исходными оценками когнитивных функций и содержанием CSF-маркеров все участники исследования были распределены в 5 групп в соответствии с критериями, приведенными в табл.1.

Таблица 1

Критерии диагностики преклинических стадий БА

Норма
CDR 0, нет амилоида или нейронального повреждения, нет даже очень легкого когнитивного снижения
Преклиническая БА, стадия 1
CDR 0, амилоид (+), нейрональное повреждение (–), очень легкое когнитивное снижение (–)
Преклиническая БА, стадия 2 (N=36)
CDR 0, амилоид (+), нейрональное повреждение (+), очень легкое когнитивное снижение (–)
Преклиническая БА, стадия 3 (N=13)
CDR 0, амилоид (+), нейрональное повреждение (+), очень легкое когнитивное снижение (+)
SNAP – предположительно неальцгеймеровская патология (N=12)
CDR 0, CSF тау или фосфо-тау (+), амилоид (–)
Симптоматическая БА (MCI амнестического типа)
CDR ≥ 0,5 память и еще 1 домен по CDR ≥ 0,5; суждение клинициста о том, что MCI обусловлен БА (безотносительно к биомаркерам)

В течение 5 лет наблюдений авторы оценили частоту диагностики синдрома MCI у включенных в когорту пожилых людей. Частота развития этого клинического синдрома оказалась минимальной среди лиц, исходно оцененных как норма, и среди тех, у кого исходно была диагностирована предположительно неальцгеймеровская патология. Среди лиц, исходно соответствовавших разным стадиям преклинической БА, показатели перехода в синдром MCI неуклонно возрастали от стадии 1 к стадиям 2 и 3 (соответственно: 11.26 и 56%).

В настоящее время высокоактуальным современным направлением в разработке превентивных стратегий БА является поиск так называемых периферических биомаркеров БА, определяемых в сыворотке крови или других биологических жидкостях организма (моча, слюна), которые не требуют применения травматичных инвазивных методов (например спинномозговой пункции) или использования чрезвычайно дорогостоящих и не доступных в широком масштабе высокотехнологичных методик (таких как PIB PET, FDG PET и др.)

В последние годы удалось достигнуть определенного прогресса в изучении периферических биомаркеров БА. С использованием современных методологических подходов (протеомика, метаболомика, масспектрометрия) открыт ряд наборов (панелей) протеинов или их метаболитов, которые могут быть потенциальными периферическими биомаркерами (Bazenet et al., 2012). Однако для подтверждения их диагностической значимости требуется валидизация этих маркеров в проспективных исследованиях.

Учитывая мультифакториальный характер альцгеймеровской нейродегенерации и фенотипическую ее неоднородность, более оправданным представляется создание мультимодальной панели биомаркеров, нежели ожидание того, что будет обнаружен один единственный биомаркер, способный надежно подтвердить альцгеймеровскую природу начального когнитивного снижения. Как известно, развитие БА определяется интеграцией множества факторов, в том числе генетических, средовых, конституциональных, соматических, хроногенных. Неоднородность таких комбинаций ответственна за разные фенотипы БА (семейные, спорадические, пресенильные, сенильные, смешанные, т.е. сочетающиеся с иными видами

церебральной патологии). По этой причине мультимодальная панель биомаркеров гипотетически должна лучше отражать комплексный характер этого заболевания, хотя способ оценки таких данных сопряжен с рядом дополнительных трудностей, и алгоритм предстоящего анализа их диагностической значимости еще только предстоит создать.

Оценивая в целом значимость новых диагностических технологий, предназначенных для диагностики БА на предементном этапе и даже на асимптоматической стадии нейродегенеративного процесса, следует подчеркнуть, что эти новые знания, сопряженные с большими научными ожиданиями, создают и много новых проблем. В частности, не ясно, какова их роль в оказании помощи здоровым с клинической точки зрения пожилым людям, у которых предположительно в ближайшие годы может обнаружиться когнитивное снижение или разовьется деменция.

Вторая проблема – скорее морально-этического свойства. В условиях, когда отсутствует способ излечения от БА или остановки ее развития, предоставление пациенту информации о неизбежном заболевании может оказать негативное влияние на его индивидуальную свободу и частную жизнь или даже будет способствовать ухудшению его здоровья и качества жизни. Например, в ответ на сообщение о неизбежном заболевании может развиться психологически понятная депрессивная реакция дезадаптации, что, само по себе, возможно, станет «триггером» в прогрессировании каскада патологических событий, характерных для БА. Многие ученые в этой связи задаются вопросом, до какой степени можно позволить новым высоким технологиям формировать жизнь людей на доклиническом (асимптоматическом) этапе развития БА. По мнению большинства клиницистов, необходимо предварительно тщательно разработать процедуры информированного согласия лиц, предположительно имеющих асимптоматическую стадию БА, на применение новых диагностических технологий, позволяющих диагностировать болезнь в продромальной стадии ее развития.

По мнению специалистов, в настоящее время существует необходимость (по крайней мере в исследовательских целях) в идентификации и последующем тестировании в клинических условиях достоверных биомаркеров БА. Представления об «идеальном» для БА диагностическом маркере должны соответствовать следующим критериям: 1) специфичность, т.е. способность определять именно альцгеймеровскую нейропатологию; 2) более чем 80-процентная чувствительность; 3) специфичность в разграничении с другими деменциями на уровне более 80%; 4) достоверность; 5) неинвазивность; 6) простота в выполнении; 7) невысокая стоимость.

Ни один из предложенных в настоящее время биомаркеров, за исключением, возможно, трех генетических – APP, PSEN1 и PSNEN2 (ответственных не более чем за 5–10% всех случаев БА), не соответствует признакам «идеального» маркера.

Новым вероятным генетическим биомаркером преклинической БА является недавно открытый ген TOMM40 (Johnson et al., 2011), ответственный за митохондриальную дисфункцию, которая влияет на патофизиологические процессы при БА через взаимодействие с Аβ и его предшественником PPAβ. Недавно было установлено, что 3 аллеля гена TOMM 40 (rs 157580; rs 2075650 и rs 1156505) накаплива-

ются в популяции больных БА, и их уровень коррелирует с ликворными маркерами БА. В соответствии с гипотезой митохондриального каскада, предполагается, что именно митохондриальная дисфункция, регулируемая аллельными вариантами гена TOMM 40, является первичным патологическим событием при БА, предшествующим нарушениям амилоидного каскада (Roses, 2010).

Среди кандидатов в ранние диагностические маркеры БА в настоящее время рассматриваются P-glucoprotein (P-gp); микроRNAS (miRNAS) и свободные ионы меди (Bazenet et al., 2012). Отечественные исследователи в качестве новых диагностических маркеров предлагают следующие: снижение уровня экспрессии или активности неприлизина (НЕП) и других амилоид-деградирующих ферментов (Наливаева и др., 2010); нарушение баланса сфинголипидов, таких как сфингомиелин и церамид (Алесенко и др., 2014).

Исследования чувствительности, специфичности и достоверности всех упомянутых биомаркеров для диагностики БА на предементном ее этапе в настоящее время находятся в процессе разработки.

2. Психопатологические и нейропсихологические подходы в разработке методов диагностики БА на додементном этапе ее развития

Проспективное исследование родственников 1 степени родства пациентов с БА. Серия исследований, направленных на поиск предвестников развития БА у родственников 1 степени родства больных БА, а также возрастных показателей риска развития болезни, привела к изучению возможных нейропсихологических маркеров БА у родственников пациентов (Jarvik et al., 2005; Small et al., 1997; Small et al., 2000). Основанием для таких исследований стала гипотеза о возможном существовании на додементном этапе болезни специфических когнитивных нарушений у лиц с высоким риском развития болезни, т.е. у родственников 1 степени родства больных БА.

При проведении такого рода исследований было установлено, что показатели когнитивных функций могут быть использованы для идентификации лиц среднего возраста, имеющих повышенный риск развития БА задолго до появления у них симптомов деменции. В 22-летнем исследовании обнаружили, что более низкие оценки по тестам вербальной памяти и абстрактного мышления имеют те лица, у которых спустя 10 лет после базисного обследования была диагностирована БА (Elias et al., 2000).

Сходные результаты получены С.Х. Кавасом с сотрудниками (Kawas et al., 2003) при обследовании группы риска. Авторы установили, что через 15 лет после базисного тестирования БА развивалась в 2 раза чаще у обследованных лиц с более низкими показателями по тестам, оценивающим зрительную память. Другие исследователи (Snowdon et al., 1996) при изучении вербальных функций обнаружили их дефицитарность за 20 лет до начала БА. В другом 20-летнем проспективном исследовании было установлено, что значимо более низкие показатели по шкале

MMSE имели дети пациентов с БА по сравнению с группой контроля (Jarvik et al., 2005).

В работе Л. Бэкмана с соавторами (Backman et al., 2005) при анализе риска развития БА у родственников 1 степени родства в сравнении с группой контроля показана определенная связь ряда низких когнитивных показателей (способность к обучению, кратковременная память, исполнительные и вербальные функции) с последующим развитием деменции в группе родственников, достигших 65-летнего возраста. При этом временной интервал, предшествующий клиническим симптомам БА, составил от 2 до 10 лет.

Сравнение результатов выполнения теста вербального обучения в когорте из 623 детей, родители которых страдали БА (средний возраст 53 г.), и группы контроля (157 чел.) показало, что у детей пациентов отмечаются достоверно более низкие результаты опосредованного воспроизведения (La Rue et al., 2008).

При изучении 100 семей детей, у которых оба родителя страдали БА, определили увеличение риска развития БА, коррелирующего с их возрастом (Jayadev et al., 2008). В 22,6% случаев в группе детей (297 чел.) БА развилась в возрасте до 60 лет, риск развития БА у детей старше 60 лет составил 31,0%, после 70 лет он вырос до 41,8%.

В более поздних исследованиях большое внимание уделялось роли носительства ε4 аллеля АроЕ-гена у родственников пациентов с БА. Л.А. Копплес с соавторами (Cupples et al., 2004) и Х. Паями с коллегами (Payami et al., 1997), в частности, показали, что риск развития БА у родственников 1 степени родства больных БА, имеющих АроЕ4(+)-генотип, является максимальным.

В недавнем 33-месячном исследовании (Caselli et al., 2004) выявились более низкие показатели вербальной памяти (запоминание и воспроизведение) и усвоения практических навыков у 87 родственников 1 степени родства больных БА (средний возраст – 60 лет) – носителей АроЕ4(+)-гена, по сравнению с 93 родственниками-неносителями ε4-аллеля.

Сходную закономерность обнаружили Дж.А. Леви с сотрудниками (Levy et al., 2004). У родственников пациентов с БА – носителей ε4-аллеля, в отличие от неносителей ε4-аллеля, установлены более низкие результаты по тестам, оценивающим вербальное запоминание и воспроизведение, внимание, а также рабочую память.

В исследовании М.А. Сагера и др. (Sager et al., 2005) при обследовании 452 родственников больных БА (45% из которых являлись гетеро- или, реже, гомозиготными по ε4-аллелю АроЕ-гена) обнаружили у пожилых родственников больных – носителей ε4-аллеля, достоверно более низкие результаты оценки зрительно-пространственной функции, а также худшие результаты в выполнении некоторых тестов.

Полученные в предшествующих исследованиях данные определили необходимость направленного поиска специфических маркеров психических нарушений когнитивного и некогнитивного спектра, которые могли бы с высокой вероятностью свидетельствовать о будущем развитии БА у их родственников 1 степени родства.

В 2008–2013 гг. в НЦПЗ РАМН проводился поиск специфических психопатологических и нейропсихологических предикторов прогрессирования когнитивных нарушений, позволяющих оценить прогноз нарастания когнитивного дефицита и/

или развития БА среди родственников 1 степени родства пациентов с БА в рамках проспективного мультидисциплинарного исследования. В когорту проспективного изучения было включено 134 родственника 1 степени родства пациентов с БА в возрасте от 24 до 79 лет (средний возраст – 47,6±12,4 года), в том числе 110 детей и 24 сибса со средним возрастом соответственно: 44,1±9,5 и 63,0±10,8 года (Селезнева и др., 2013).

Использовались следующие инструменты исследования: 1) клиническая карта обследуемого; 2) формализованный инструмент клинической и психопатологической оценки состояния пациента, включающий шкалу MMSE (Mini-Mental State Examination – Мини-тест оценки когнитивных функций) (Folstein et al., 1975); шкалу Гамильтона для оценки депрессии (Hamilton, 1959); шкалу Гамильтона для оценки тревоги (Hamilton, 1959); Модифицированную шкалу Хачински (Hachinski, 1978) для дифференциации первично дегенеративных состояний от сосудистых церебральных заболеваний; 3) психодиагностический комплекс, направленный на оценку когнитивной и личностной сферы. В психодиагностический комплекс входили: 1) Экспресс-методика для исследования когнитивной сферы (Корсакова и др., 2009); 2) Тест Мюнстерберга (Райгородский, 2011); 3) 6 субтест теста Векслера; 4) Тест Кеттела; 5) Тест Спилбергера–Ханина (Райгородский, 2011).

Молекулярно-генетическое обследование проводилось в лаборатории молекулярной генетики мозга НЦПЗ РАМН. Геномная ДНК выделялась из лейкоцитов периферической крови с помощью стандартной методики фенол/хлороформной экстракции. Генотипирование ApoE-аллелей проводилось методом полимеразной цепной реакции по стандартной процедуре (Коровайцева и др., 2001).

Группа контроля состояла из 22 чел., не имевших среди родственников пациентов с БА (4 м., 18 ж.) в возрасте от 28 лет до 71 года (средний возраст – 42,1±11,3 года). Половина обследованных из группы контроля получила высшее образование, половина – среднее или среднее специальное. Наличие ε4-аллеля ApoE-гена установлено только в двух случаях из 20 (9,1%). По среднему возрасту и распределению по полу обследованных группы родственников и контроля не различались. В группе контроля статистически достоверно (по сравнению с основной группой) преобладало число лиц со средним образованием ($p=0,01$) и с генотипом ApoE4(–) ($p=0,008$).

При анализе ретроспективных анамнестических данных у включенных в исследование родственников больных БА была установлена высокая частота (68,7%) признаков конституциональной когнитивной недостаточности в анамнезе (Селезнева и др., 2012).

Большинство обследованных родственников указывали на имевшие место в школьном возрасте трудности усвоения точных наук (21,6%) и запоминания цифрового материала (25,4%), затруднения в ориентировке в пространстве (23,1%) и усвоении мануальных навыков (27,6%). Еще чаще (31,3%) они отмечали затруднения при запоминании имен и фамилий, реже – трудности запоминания лиц (16,4%), моторную неловкость (12,7%) и «корявость» почерка (7,5%).

При объективном исследовании те или иные когнитивные нарушения были выявлены у 66,2% родственников; чаще всего в виде трудностей концентрации внимания (36,9%) и/или усвоения новой информации (34,4%).

При психопатологическом обследовании у 31,3% родственников диагностировалась депрессивная реакция дезадаптации, более чем у трети обследованных (35,8%) – астенические расстройства (пониженная работоспособность, связанная с переутомлением или стрессогенными факторами, и повышенная утомляемость), а также нарушения сна (14,9%).

У значительной части родственников (68,7%) отмечены различные фобии (чаще всего – альцгеймерофобия). Более чем у половины обследованных выявлены признаки эмоциональной лабильности (52,2%) и раздражительности (53,7%) или сниженное настроение (51,2%). Тревожные реакции имели место у 44,0% обследованных.

43,3% родственников высказывали так называемые церебральные жалобы (головные боли, головокружения, чувство тяжести в голове), которые они связывали с последствиями осложненных родов, перенесенных в детстве ЧМТ, менингитом, или с повышенным или пониженным АД, метеозависимостью, переутомлением и др.

Более чем у трети обследованных обнаружены личностные девиации, которые соответствовали акцентуации по возбудимому типу (14,9%), эмоционально-лабильному (9,7%), тревожно-мнительному (9,0%) или истероидному (9%) типам.

В группе контроля частота легких признаков конституциональной когнитивной недостаточности в анамнезе встречалась статистически достоверно реже, чем в группе родственников ($p=0,03$). В группе контроля в 2,4 раза реже отмечались затруднения усвоения точных наук, в 1,6 раз реже – трудности запоминания имен и фамилий, в 4,3 раза реже – затруднения в усвоении мануальных навыков по сравнению с группой родственников. Различий между группами родственников и контроля по частоте признаков дефицитарности в ориентировке в пространстве и в запоминании цифрового материала и лиц не обнаружено. Такие проявления, как «корявость» почерка и признаки моторной дефицитарности, были обнаружены только среди родственников больных БА.

Среди родственников 1 степени родства также достоверно чаще по сравнению с группой контроля обнаруживались психопатологические расстройства: невротические симптомы и нарушения астенического спектра (утомляемость, пониженная работоспособность, раздражительная слабость), а также депрессивная реакция дезадаптации.

Подтверждением полученных данных служат результаты исследования (Kawas et al., 2003), свидетельствующие о большей частоте у родственников 1 степени родства когнитивного дефицита по сравнению с группой контроля (соответственно: 55% и 20%) (Kawas et al., 2003), а также данные о более раннем и более выраженном когнитивном дефиците у родственников больных с ранним началом БА, по сравнению с заболевшими в позднем возрасте или группой контроля (Jarvik et al., 2005).

При молекулярно-генетическом обследовании 38,1% обследованных родственников 1 степени родства оказались носителями ApoE4(+)-генотипа. При этом у детей больных с диагностированным синдромом MCI (4 чел.) генотип ApoE4(+) встречался в 1,7 раза чаще, чем генотип ApoE4(–) (различия статистически незначимы).

Ретроспективная оценка частоты разных видов конституциональной когнитивной недостаточности в зависимости от ApoE-генотипа показала, что в группе родственников в целом трудности запоминания цифрового материала и усвоения мануальных навыков статистически значимо чаще отмечены у лиц, имеющих генотип ApoE4(+). Трудности усвоения точных наук, запоминания имен и фамилий, трудности ориентировки в пространстве и запоминания лиц, «корявость» почерка и моторная неловкость также несколько чаще встречались у родственников с генотипом ApoE4(+) (различия статистически незначимы). При этом как у детей, так и у сибсов, имеющих генотип ApoE4(+), по анамнестическим данным, выявлена большая частота практически всех вышеперечисленных видов конституциональной когнитивной недостаточности (но различия не достигли статистической значимости).

Сравнительный анализ частоты когнитивных и некогнитивных расстройств, выявленных при обследовании детей и сибсов больных БА, выявил ряд различий. Симптомы депрессивного круга определены у 50,0% детей и у 58,3% сибсов. В общей группе и среди детей симптомы депрессии чаще (статистически незначимо) отмечались у лиц с генотипом ApoE4(+). В группе сибсов частота депрессивных расстройств не зависела от генотипа ApoE4(+).

Астенические расстройства (пониженная работоспособность, повышенная утомляемость), обусловленные утомлением и стрессом и длящиеся от 1 до 10 лет, в группе детей встречались с частотой 38,3% и не ассоциировались с генотипом ApoE. В группе сибсов частота лиц с указанными проявлениями в 1,7 раза преобладала при наличии генотипа ApoE4(+): 33,3% и 20,0% соответственно (различия статистически незначимы).

Готовность к тревожным реакциям выявлена у 45,4% детей и 37,5% сибсов. Ассоциации симптомов тревоги у детей с ApoE-генотипом не установлено, а в группе сибсов тревожные реакции чаще (незначимо) встречались у лиц с генотипом ApoE4(+).

Различий в частоте фобий у детей и сибсов (в том числе альцгеймерофобии) не обнаружено (соответственно: у 69,1% детей и у 66,7% сибсов), ассоциации между выявлением фобий и ApoE4(+)-генотипом также не было установлено. «Церебральные» жалобы (головные боли, головокружения, тяжесть в голове) высказывали 40,0% детей и 54,2% сибсов. Ассоциации «церебральных» жалоб с генотипом ApoE4 также не было установлено.

Результаты нейропсихологического и психодиагностического исследования родственников 1 степени родства больных БА показали, что при выполнении теста Мюнстерберга (произвольное внимание) по двум параметрам («количество найденных слов» и «количество пропущенных слов») у них наблюдались более низкие результаты по сравнению с группой контроля, значимые различия получены по параметру «количество пропущенных слов» ($p=0,05$). По результатам выполнения Субтеста 6 из теста Векслера у родственников обнаружен значимо ($p=0,05$) меньший объем воспроизведения цифр в обратном порядке по сравнению с контролем.

По «Опроснику Реактивной и Личностной тревожности» получены значимо ($p=0,02$) более высокие показатели уровня реактивной тревожности у родствен-

ников 1 степени родства больных БА. Сравнение результатов выполнения «Экспресс-методики для исследования мнестико-интеллектуальной сферы» показало, что значимо более низкие результаты по общему баллу и 7 субтестам показали родственники по сравнению с контрольной группой (различия достигали уровня значимости (p=0,05) по параметрам зрительной и слухо-речевой памяти).

Применение «Экспресс-методики для исследования мнестико-интеллектуальной сферы» у родственников-носителей ApoE4(+)- и ApoE4(–)-генотипов показало, что из 12 по 9 субтестам и общему баллу у родственников с ApoE4(+)-генотипом наблюдались более низкие результаты, чем у родственников-носителей ApoE4(–)-генотипа. Значимые различия (p=0,05) наблюдались при выполнении серийного вычитания (100–7) и рисунка трех геометрических фигур по инструкции (конструктивная деятельность). Также более низкие результаты показали родственники с ApoE4(+) при заучивании 10 слов (произвольная слухо-речевая память), однако эти различия не достигали уровня значимости.

Анализ выполнения экспресс-методики детьми и сибсами больных БА обнаружил неоднородность полученных результатов. У сибсов обнаружено наличие значимых различий (p=0,05) в зависимости от генотипа по 3-му субтесту (рисунок трех геометрических фигур по инструкции) и по 8-му субтесту (заучивание 10 слов): у сибсов с ApoE4(–)-генотипом результаты оказались значимо хуже, хотя по общему баллу различия не достигали уровня значимости. У детей с ApoE4(–)-генотипом наблюдались достоверно худшие результаты (p=0,05) только по 8-му субтесту (заучивание 10 слов).

Субтест 6 из теста Векслера (воспроизведение цифровых рядов в прямом и обратном порядке) использовался для оценки кратковременной вербальной памяти. Результаты показали, что по всем параметрам (общий балл, объем воспроизведения в прямом и обратном порядке) у родственников с ApoE4(–)-генотипом оценки были выше, чем у родственников с ApoE4(+)-генотипом. При этом по общему баллу и объему воспроизведения в обратном порядке различия достигали уровня значимости (p=0,02).

Сравнение результатов у сибсов в зависимости от генотипа показало, что у сибсов с ApoE4(+)-генотипом обнаружены достоверно худшие результаты по общему баллу и объему воспроизведения в обратном порядке. Аналогичное сравнение в группе детей показало достоверно худшие результаты (p=0,05) у детей с ApoE4(+)-генотипом только по объему воспроизведения в обратном порядке.

Результаты выполнения теста Мюнстерберга (произвольное внимание) по параметру «количество найденных слов» оказались выше у родственников с ApoE4(–)-генотипом, но эти различия не достигали уровня достоверности. По параметру «количество пропущенных слов» результаты были достоверно (p=0,05) хуже у родственников с ApoE4(+)-генотипом. Эти данные указывают на снижение показателей произвольного внимания и контроля у родственников-носителей ApoE4(+)-генотипа. Сопоставление результатов выполнения этого теста у детей и сибсов больных в зависимости от их генотипа показало, что по параметру «количество пропущенных слов» достоверно худшие результаты (p=0,02) наблюдались как у детей, так и сиб-

сов с ApoE4(+)-генотипом. Аналогичная зависимость обнаружена у детей больных БА.

Таким образом, по результатам нейропсихологического и психодиагностического исследования у родственников 1 степени родства больных БА по сравнению с группой контроля установлены достоверно худшие параметры произвольного внимания и контроля, объема кратковременной слухо-речевой и зрительной памяти и достоверно более высокий уровень реактивной тревожности.

У группы родственников ApoE4(+)-генотип достоверно коррелировал с худшими параметрами конструктивной деятельности, объема кратковременной слухо-речевой памяти, произвольного внимания и контроля.

Между детьми и сибсами-носителями APOE4(+)-генотипа наблюдались достоверные различия по двум показателям: у детей – более высокие показатели реактивной тревожности, у сибсов – худшие параметры конструктивной деятельности.

По данным катамнестической оценки, группы фенотипически здоровых родственников 1 степени родства спустя 4 года после первичного их обследования в 2,9% случаев была диагностирована БА, а в 10,4% – синдром MCI. При этом в группе детей БА развивалась в 3 раза чаще, чем у сибсов (различия статистически значимы, p=0,04). У сибсов в 1,3 раза чаще (по сравнению с группой детей) развивался синдром MCI (различия статистически значимы, p=0,005). При наличии генотипа ApoE4(+) у родственников 1 степени родства синдром MCI развивался достоверно чаще (p=0,004), тогда как БА значимо чаще развивалась у родственников-носителей генотипа ApoE4(–) (p=0,02).

По оценке нейропсихологических данных у всех обследованных родственников 1 степени родства, у которых через 4 года развивалась БА или синдром MCI, при первичном обследовании были установлены более низкие показатели произвольного внимания, объема непосредственного запоминания в слухо-речевой модальности, отсроченного воспроизведения, дефицитарность динамического праксиса, снижение уровня выполнения заданий на конструктивный праксис, хотя по сравнению с родственниками, у которых за этот период не наблюдалось нарастания когнитивного дефицита, первичная оценка когнитивного функционирования (по шкале MMSE) у тех и других соответствовала норме (28–29 баллов). В анамнезе родственников с прогрессированием когнитивного дефицита отмечались признаки конституциональной недостаточности когнитивных функций в виде трудностей усвоения точных предметов в школе и запоминания цифровой информации, имен, фамилий и лиц или в сфере пространственной ориентировки, в усвоении мануальных навыков.

Таким образом, исходя из установленных данных, можно предполагать, что возможными предикторами развития деменции, обусловленной БА, или синдрома MCI в ближайшие 4 года могут быть указанные выше дефицитарные показатели когнитивной деятельности. В отношении этих лиц, относящихся к группе высокого риска по БА, должны проводиться программы коррекционно-реабилитационных мероприятий, направленных на профилактику прогрессирования когнитивного дефицита.

3. Прогностическая значимость синдрома «мягкого когнитивного снижения» по данным длительного комплексного исследования

Для определения прогностической значимости синдрома «мягкого когнитивного снижения» (Mild cognitive impairment, MCI) было предпринято клиническое исследование невыборочной когорты пожилых людей, соответствующих современным критериям диагностики амнестического типа синдрома MCI (Marilyn et al., 2011), который в настоящее время предположительно оценивается как предементная стадия БА.

В когорту проспективного исследования включались пациенты в возрасте 50 лет и старше, которые соответствовали приведенным ниже операциональным критериям, основанным на соглашении международной исследовательской группы по MCI (Petersen et al., 2005), т.е. на основании предъявляемых пациентом и подтверждаемых объективным информантом жалоб на снижение памяти и/или легкие когнитивные нарушения, которые можно было подтвердить с помощью нейропсихологического тестирования; выраженность когнитивного снижения должна соответствовать оценке >24 баллов по шкале MMSE (Folstein et al., 1975), оценке <1 по шкале тяжести деменции (Clinical Dementia Rating – CDR) (Morris, 1993), и 1 – 3 стадии по шкале общего ухудшения (Global Deterioration Scale – GDS) (Reisberg et al., 1982) при сохранной повседневной активности пациентов (возможно только легкое ухудшение в наиболее сложных видах повседневной или социальной активности); диагноз деменции в соответствии с критериями МКБ-10 еще не может быть поставлен.

Критериями исключения являлись любые неврологические, психические или соматические заболевания, которые могли быть ответственны за когнитивную недостаточность пациента.

В работе был применен *мультидисциплинарный методический подход,* включающий клинико-катамнестический, психопатологический, психометрический, нейропсихологический, нейроинтраскопический (МРТ или КТ) и молекулярно-генетический (определение генотипа ApoE4) методы исследования.

Для первичной и динамической оценки состояния когнитивных функций пациентов применялись следующие психометрические тесты и клинические шкалы: мини-тест психического состояния (MMSE), батарея лобной дисфункции (Frontal Assessment Battery – FAB) (Dubois, 2000), тест рисования часов (Clock Drawing Test – CDT) (Shulman, 1986), тест воспроизведения «10 слов» (Лурия, 1962), тест «Узнавание рисунков» (Лурия, 1962), бостонский тест называния (Boston Naming Test – BNT) (Kaplan et al., 1983), тесты «Повторение цифр» и «Звуковые ассоциации» из шкалы Векслера для взрослых (Wechsler, 1974).

Для исключения вероятной связи когнитивного снижения с цереброваскулярной патологией или с депрессивными расстройствами в дополнение к клиническим методам использовались клинические диагностические шкалы: модифицированная шкала Хачинского (Modified Hachinski Ischemia Scale – MIS) (Hachinski, 1978) и гериатрическая шкала депрессии (Geriatric Depression Scale – GDeprS) (Yesavage et al., 1983).

Состояние высших психических функций (ВПФ) у всех включенных в когорту лиц также оценивалось с применением нейропсихологического подхода, основанного на адаптированной для данного контингента пациентов методике А.Р. Лурии. Использовалась шкала количественной оценки степени выраженности нарушений различных составляющих психической деятельности (Рощина, Жариков, 1998).

Для исключения объемных образований, воспалительных, травматических или иных органических повреждений головного мозга, оценки выраженности расширения ликворной системы и очаговых (сосудистых) изменений проводилось МРТ-исследование головного мозга. МРТ-картина у пациентов обследованной когорты характеризовалась преимущественно слабой или реже умеренной наружной и внутренней сообщающейся гидроцефалией, но более чем у половины пациентов были выявлены единичные мелкоочаговые изменения в подкорковых структурах.

Генетическое исследование проводилось в лаборатории молекулярной генетики мозга ФГБУ «НЦПЗ» РАМН. Геномная ДНК выделялась из лейкоцитов периферической крови с помощью стандартной методики фенол/хлороформной экстракции. Генотипирование ApoE 4 аллелей проводилось методом полимеразной цепной реакции по стандартной процедуре.

Анамнестические сведения на всех пациентов восстанавливались ретроспективно на основании данных, полученных как с их слов, так и от одного или двух объективных информантов, а также из имеющейся медицинской документации (амбулаторные карты поликлиник, истории болезни или выписки соматических стационаров).

В соответствии с указанными критериями отбора в когорту проспективного исследования было включено 79 пожилых лиц (29 мужчин и 50 женщин) в возрасте от 50 до 90 лет (средний возраст 68,03±8,58 года), отобранных из числа лиц, обратившихся за консультативной помощью в отделение болезни Альцгеймера и ассоциированных с ней расстройств ФГБУ «НЦПЗ» РАМН и соответствовавших критериям «включения–исключения». Большинство пациентов (63,3%) были в возрасте старше 65 лет. Меньшая часть обследованных (36,7%) относилась к возрастной группе от 50 до 64 лет.

Большинство включенных в исследование пациентов (75%) имели высшее образование, остальные – среднее специальное образование. Треть из них на момент первичного обследования занимались трудовой деятельностью. Остальные пациенты были пенсионерами по возрасту или в связи с инвалидностью по совокупности соматических заболеваний.

При первичном исследовании клиническая картина синдрома MCI у включенных в исследование пациентов определялась широким спектром легких когнитивных дисфункций, в целом соответствующих тем, которые были описаны ранее на доклиническом этапе течения БА по ретроспективным анамнестическим данным (Селезнева, 1990; Калын, 1990; Федорова, 2006). У всех без исключения пациентов объективно выявлялись легкие амнестические расстройства, преимущественно нарушения запоминания новой информации и воспроизведения событий недавнего прошлого. Кроме того, у всех пациентов были установлены другие легкие когнитивные дисфункции, которые охватывали разные сферы когнитивной деятельности, в том числе функции речи, праксиса, оптико-пространственной деятельности,

счета, письма, внимания и собственно интеллектуальной, то есть аналитико-синтетической деятельности. В целом структура синдрома MCI у лиц, включенных в исследование, соответствовала амнестическому моно- или мультифункциональному типу синдрома MCI (Petersen, 2000).

Продолжительность периода проспективного наблюдения составила не менее 2 лет. У 83,5% пациентов (66 человек) период проспективного наблюдения составил 4 года.

Через 2 года проспективного наблюдения у 65,8% состояние когнитивного функционирования оставалось стабильным, не наблюдалось и нарастания нарушений повседневной деятельности. У 21,5% пациентов за этот период произошло нарастание когнитивного дефицита (без деменции) и 12,7% – был поставлен диагноз деменции, обусловленной БА.

Через 4 года наблюдения состояние только у 53,1% пациентов осталось стабильным, а диагноз деменции вследствие БА получили уже 22,7% от общей численности первично обследованной когорты пациентов. У 24,2% установлено нарастание когнитивного дефицита без деменции, при этом 11 из них (16,6%) при катамнестической оценке через 2 года наблюдения были отнесены к числу лиц со стабильным состоянием.

Оценка прогностической значимости когнитивных и некогнитивных симптомов синдрома MCI была проанализирована для группы пациентов, прослеженных на протяжении 2 лет и получивших исчерпывающую патопсихологическую, психометрическую и нейропсихологическую оценку динамики различных составляющих синдрома MCI, в том числе, в зависимости от наличия у них генетического фактора риска по БА – генотипа ApoE4(+). Эта группа состояла из 40 пациентов (12 мужчин и 28 женщин) среднего и пожилого возраста (от 50 до 80 лет, средний возраст 69,3±7,2). Преобладали пациенты в возрасте от 65 до 74 лет (60%), возрастные группы от 50 до 64 лет и старше 75 лет составили по 20% от общего числа лиц, включенных в анализируемую группу.

У трети из этих пациентов помимо когнитивных дисфункций при первичном обследовании были также определены легкие аффективные нарушения: пониженное настроение, в основном ситуационно обусловленное неблагоприятной служебной или семейной ситуацией или в связи с появившимися когнитивными дисфункциями. Гипотимический аффект сопровождался снижением психической и физической активности, ограничением контактов с друзьями, коллегами и родственниками. Длительность таких состояний до включения пациентов в исследование была различной: от 1 месяца до 1 года. У 15% включенных в когорту лиц были выявлены псевдоневрастенические расстройства (повышенная утомляемость, непереносимость обычных нагрузок, постоянное отсутствие бодрости, повышенная чувствительность к внешним раздражителям, жалобы на периодические головные боли и снижение работоспособности). В части случаев псевдоневрастенические расстройства сочетались со сниженным настроением, раздражительностью и плаксивостью.

У 37,5% пациентов при первичном обследовании обнаружены нерезко выраженные личностные изменения. В ряде случаев они сочетались с дистимическим

аффектом. Личностные изменения у половины из них носили характер психопатоподобных (с возбудимостью, вспыльчивостью, требовательностью, нетерпимостью к возражениям, обидчивостью). Реже отмечалось сглаживание личностных особенностей с ослаблением эмоциональных привязанностей, появлением равнодушия к близким, безразличия к своему внешнему виду, снижение прежних интересов и активности. У 20% включенных в эту когорту лиц личностные изменения приближались к сенильноподобным, т.е характеризовались появлением придирчивости, мелочности, эгоистичности, подозрительности, не свойственных им раннее. Признаки сенильноподобного личностного сдвига в основном выявлялись у пациентов старше 65 лет, тогда как психопатоподобные характерологические изменения главным образом встречались у лиц, не достигших 65-летнего возраста.

За 2-летний период проспективного исследования 10% из анализируемой когорты выпали из наблюдения по причинам немедицинского характера.

Для оценки прогностической значимости исходных клинических, генетических и психометрических характеристик синдрома MCI амнестического типа использовались данные только тех пациентов, которые были оценены через 2 года по той же методике, что и при стартовом обследовании (36 человек). По данным катамнестической оценки, у 63,9% из них на протяжении 2 лет не наблюдалось нарастания когнитивной недостаточности или признаков функционального снижения (1 группа). У 36,1% пациентов установлено нарастание когнитивного снижения (2 группа).

В качестве критериев прогрессирования когнитивного снижения рассматривалось нарастание объективных признаков функциональной недостаточности в повседневной, социальной или профессиональной сфере в сочетании с наличием двух или более перечисленных ниже признаков: 1) снижение оценки по MMSE на 1 балл и более; 2) снижение оценки в Бостонском тесте называния более чем на 1 балл; 3) снижение оценки в тесте рисования часов на 1 балл и более; 4) снижение суммарной оценки нарушений высших психических функций (ВПФ) по данным нейропсихологического обследования не менее чем на 0,5 балла в любом из трех блоков мозга.

Более чем у трети пациентов 2-й группы, т.е. у 13,9% от общего числа прослеженных пациентов когорты, при катамнестической оценке была диагностирована деменция, обусловленная БА (подгруппа 2-А). У остальных двух третей пациентов с прогрессированием когнитивного дефицита, т.е. у 22,2% от общего числа пациентов когорты (подгруппа 2-Б), несмотря на нарастание когнитивного дефицита диагноз деменции еще не мог быть поставлен.

Подтверждением стабильного состояния пациентов 1-й группы на протяжении 2-летнего периода наблюдения служило отсутствие негативной динамики (по показателям тестовой оценки) их когнитивного функционирования. На рис. 1 представлены результаты оценки в баллах (ось ординат) по основным психометрическим и клиническим шкалам и тестам (ось абсцисс) пациентов 1-й группы при первичном обследовании и через 2 года наблюдения. Статистический анализ (статистическая обработка проводилась с использованием программы «Statistica Electronic Manual 6,0» на персональном компьютере типа IBM) не выявил у этой группы пациентов

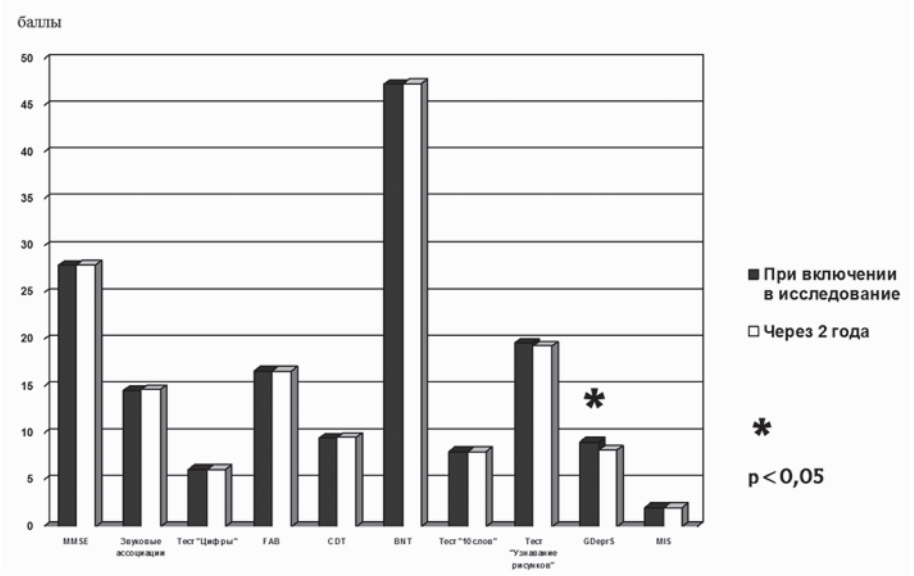


Рис. 1. Динамика клинических и психометрических показателей у пациентов 1-й группы

значимых статистических различий между исходной и катамнестической оценками по когнитивным тестам. Достоверно изменились только оценки по гериатрической шкале депрессии в сторону уменьшения субдепрессивных симптомов, выявленных у этих пациентов при первичном обследовании.

У пациентов 2-А-подгруппы (рис. 2), с диагностированной к моменту катамнестического обследования БА, напротив, установлено статистически значимое

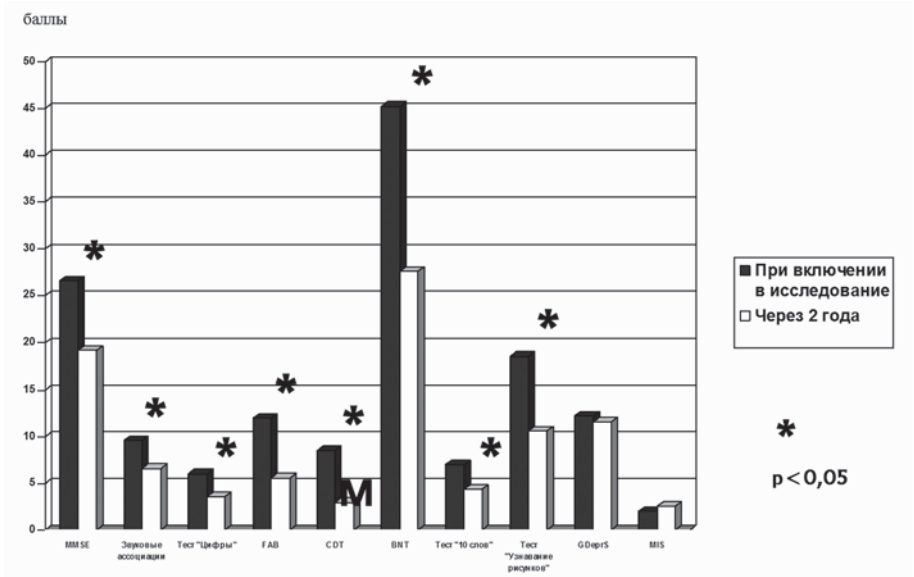


Рис. 2. Динамика клинических и психометрических показателей у пациентов 2-А-подгруппы

ухудшение показателей практически по всем психометрическим тестам и шкалам. При этом не было установлено различий по Гериатрической шкале депрессии и по модифицированной шкале Хачинского, отражающих выраженность соответственно депрессии и церебральной сосудистой патологии, что служит подтверждением того, что негативная динамика когнитивного функционирования у этих пациентов не была обусловлена нарастанием за период наблюдения депрессивных или церебрально-сосудистых расстройств.

У пациентов 2-Б-подгруппы (рис. 3), у которых установлено прогрессирование когнитивного дефицита, но без перехода в деменцию, также не было определено значимых различий ни по Гериатрической шкале депрессии, ни по модифицированной шкале Хачинского, что подтверждает спонтанную отрицательную динамику когнитивного дефицита и в этой подгруппе. В отличие от пациентов 2-А-подгруппы у пациентов 2-Б-подгруппы достоверно ухудшились показатели только по 5 из 8 применявшихся когнитивных тестов и шкал, тогда как показатели 3 остальных тестов (рисования часов, воспроизведения 10 слов и шкалы MMSE) ухудшились только в минимальной степени.

Для установления возможных прогностических критериев динамики синдрома MCI в течение следующего за первичной оценкой двухлетнего периода были проанализированы межгрупповые различия в исходных клинических и психометрических характеристиках пациентов по традиционно используемому для этих целей критерию Стьюдента при уровне значимости 0,05. Пациенты «стабильной» группы оказались достоверно моложе пациентов из группы с прогрессированием когни-

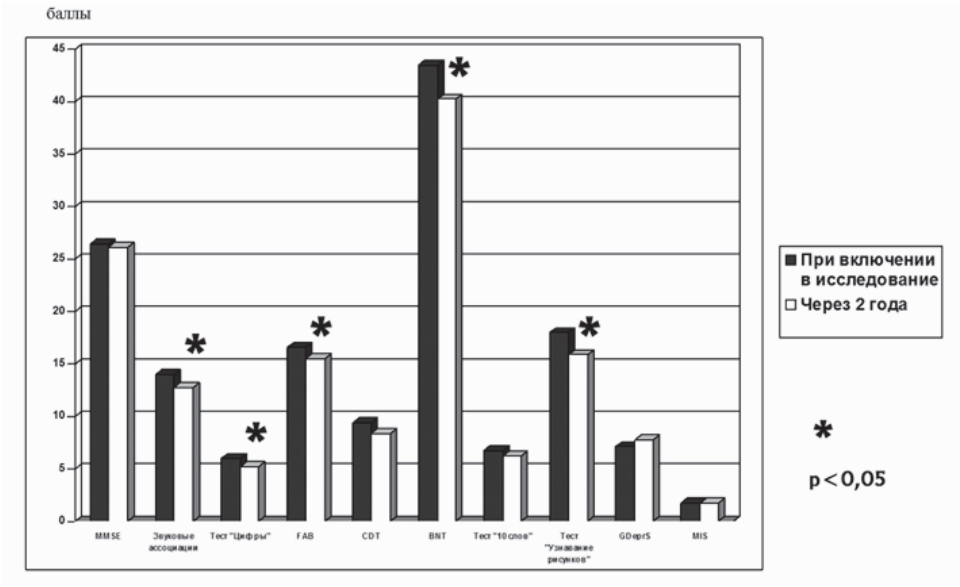


Рис. 3. Динамика клинических и психометрических показателей у пациентов 2-Б-подгруппы

Оценки в баллах (ось ординат) по основным психометрическим и клиническим шкалам и тестам (ось абсцисс) пациентов при первичном обследовании и через 2 года наблюдения

тивного дефицита, средний возраст пациентов составил соответственно: 67,7±7,1 (в 1-ой группе) и 73,3±4,4 (во 2-й группе). В то же время достоверных различий между 1-ой группой и 2-А-подгруппой не было, хотя средний возраст больных 2-А -группы превышал таковой у пациентов 1-й группы (соответственно: 72,0±6,2 и 67,7±7,1). Достоверных возрастных различий между прогрессирующей до деменции (2-А) и прогрессирующей без деменции (2-Б) подгруппах также не было (соответственно: 72,0±6,2 и 74,1±3,0).

Сравнительная характеристика исходной психопатологической структуры синдрома MCI и сравнительная частота генетического фактора риска по БА – генотипа ApoE4 – в зависимости от 2-летней динамики синдрома представлена в табл. 2. Исходное функциональное состояние всех обследованных пациентов соответствовало оценке CDR–0,5, но среднегрупповые исходные оценки по шкале MMSE у пациентов 1-й группы оказались достоверно лучшими, нежели у пациентов 2-й группы. Достоверные межгрупповые различия по модифицированной шкале Хачинского (в обеих группах показатели этой шкалы были минимальными) отсутствовали. В отличие от 1-й и 2-Б-подгрупп у пациентов 2-А-подгруппы исходные средние групповые показатели GDeprS указывали на наличие признаков субдепрессии (12,20±4,87). Признаки сенильноподобного характерологического сдвига в структуре синдрома MCI у пациентов 2-й группы встречались в 12,5 раз чаще, нежели у пациентов 1-ой группы, причем частота этого признака оказалась максимальной

Таблица 2

Сравнительная характеристика исходной психопатологической структуры синдрома MCI и частоты генотипа ApoE4 в зависимости от его 2-летней динамики

Группы	Возраст (годы) M±SD	MMSE (Mini-Mental Stata Examination) M±SD	MIS (Модифицированная шкала Хачинского), баллы, M±SD	GDeprS (Geriatric Depression Scale), баллы, M±SD	Частота сенильноподобного характерологического сдвига		ApoE4(+) генотип	
					абс.	%	абс.	%
1 группа (N=23)	67,7±7,1	28±0,9	2,0±0,8	9,09±4,1	1	4,3	9	39,1
2 группа (N=13) В том числе:	73,3±4,4*	26,5±0,7	1,9±1,0	9,08±4,2	7	53,8	10	76,9
2-А подгруппа (N=5)	72,0±6,2	26,6±0,6**	2,0±1,4	12,20±4,9	4	80	4	80
2-Б подгруппа (N=8)	74,1±3,0***	26,4±0,8***	1,8±0,7	7,13±2,2	3	37,5	6	75

* – достоверные различия (p <0,05) между 1-й и 2-й группами; ** – достоверные различия (p <0,05) между 1-й группой и 2-А-подгруппой; *** – достоверные различия (p <0,05) между 1-й группой и 2-Б-подгруппой

у пациентов 2-А-подгруппы (80%). Среди пациентов 2-Б-подгруппы его частота также оказалась в 8,7 раз выше, нежели у пациентов 1-ой (стабильной) группы (соответственно: 37,5% и 4,3%). Достоверные межгрупповые различия были, кроме того, установлены по частоте генотипа ApoE 4(+): в случае прогрессирующего течения синдрома MCI генотип ApoE 4(+) выявлялся у пациентов 2-А- и 2-Б-подгрупп соответственно в 2,0 и 1,9 раза чаще, нежели у пациентов 1-ой группы.

Для определения 2-летней прогностической значимости исходной тестовой оценки когнитивных функций был проведен дополнительный статистический анализ их внутригрупповых различий по всем изучавшимся психометрическим параметрам. Достоверные различия исходных психометрических показателей между 1-ой (стабильной) группой и прогрессирующей до деменции (2-А) подгруппой были установлены помимо ранее упоминавшейся шкалы MMSE (соответственно: 28±0,9 и 26,6±0,6; p=0,003),также в тестах FAB (соответственно: 16,7±0,8 и 12±2,4; p=0,00001), CDT (соответственно: 9,5±0,9 и 8,5±1,0; p=0,03) и «Звуковые ассоциации» (соответственно: 14,6±3,5 и 9,6±4,0; p=0,009). При сравнении 1-ой группы и 2-Б-подгруппы достоверные различия выявлены только по шкале MMSE (соответственно: 28±0,9 и 26,4±0,8, p=0,001) и тесту «Воспроизведение 10 слов» (соответственно: 8,1±1,2 и 6,8±1,3, p=0,01). Как наиболее прогностически значимые психометрические тесты, коррелирующие с вероятностью развития деменции у лиц с синдромом MCI в течение ближайших двух лет, были определены тесты FAB, CDT, тест «Звуковые ассоциации».

Оценка прогностической значимости медикаментозного лечения не входила в задачи настоящего исследования. Однако для повышения достоверности полученных результатов мы сравнили 2-летний исход синдрома MCI у пациентов, получавших в течение первых 6 месяцев исследования стандартный курс лечения препаратом танакан (EGb 761) в дозах 240 мг/сут (перорально), и у тех пациентов, кто не получал такого лечения. Как показали результаты сравнительного анализа, проведение на начальном этапе исследования курса терапии не оказало влияния на последующий отдаленный исход. Среди больных с прогрессированием когнитивного дефицита доля лиц, получавших полугодовую терапию танаканом, оказалась почти вдвое выше, нежели в группе пациентов со «стабилизацией» состояния (соответственно: 92,3 и 56,5%).

Таким образом, анализ психопатологической структуры, клинических и психометрических характеристик пациентов, соответствующих международным критериям диагностики синдрома MCI, показал клиническую и генетическую неоднородность этого синдрома. Двухлетний катамнез когорты таких пациентов обнаружил различную динамику когнитивного и функционального дефицита: от стабилизации состояния (63,9% от общего числа катамнезированных пациентов) до развития деменции альцгеймеровского типа (13,9%) или прогрессирования когнитивного дефицита, которое за период наблюдения не достигло уровня деменции (22,2%).

Анализ исходных межгрупповых различий у пациентов с разной динамикой синдрома MCI позволил установить неблагоприятные прогностические характеристики синдрома. Пациенты с прогрессированием когнитивного дефицита в те-

чение ближайших двух лет были достоверно старше по возрасту, нежели лица со стабильным состоянием когнитивных функций.

Пациенты, у которых спустя 2 года был поставлен диагноз БА, отличались от «стабильной» группы девятнадцатикратно большей частотой присутствия в структуре синдрома признаков сенильноподобного характерологического сдвига (соответственно 80 и 4,3%), а также вдвое большей частотой генотипа ApoE 4(+) соответственно: 80 и 39,1%. По исходным психометрическим характеристикам достоверные различия между стабильным и прогрессирующим до деменции вариантами синдрома MCI установлены только по четырем из восьми применявшихся психометрических тестов: MMSE, Батарее лобной дисфункции, тесту рисования часов и тесту «Звуковые ассоциации», причем наиболее значимыми из них следует считать показатели Батареи лобной дисфункции.

4. Прогностическая значимость нейропсихологического подхода для доклинической диагностики БА

Дополнительно были проанализированы возможности применения нейропсихологического подхода, основанного на традиционном для отечественной нейропсихологии методе синдромного анализа нарушений психических функций при нормальном старении, а также при деменциях позднего возраста. Для изучения диффузных изменений в церебральном функционировании при нормальном и патологическом старении в отечественной нейропсихологии используется структурно-функциональная модель мозга (ФБМ) (Лурия, 1973).

Применение этой модели к решению задач ранней диагностики БА на предементном этапе в группе из 54 пациентов (средний возраст – 69,3±7,2) с синдромом MCI в течение 4-летнего периода проспективного наблюдения позволило выделить основные составляющие нейропсихологического синдрома снижения высших психических функций (ВПФ) и их иерархию у пациентов с MCI. Количественная обработка результатов нейропсихологического исследования проводилась с применением шкалы количественной оценки нарушений ВПФ у больных позднего возраста (Рощина, Жариков, 1998). Сравнение структуры нарушений ВПФ при первичном и катамнестическом обследовании позволяет сделать выводы о нейропсихологических критериях прогноза MCI на основе концепции ФБМ.

Через четыре года после первичного обследования когорта пациентов распределилась на две подгруппы. В первую подгруппу вошли 59,3%, у которых не наблюдалось отрицательной динамики когнитивной сферы. При этом 38,8% из них при первом обследовании были отнесены к «энергетическому» варианту (1 блок мозга) нормального старения с незначительным усилением тормозимости следов памяти и сужением объема психической деятельности. Вторая часть этой стабильной подгруппы (20,4%) имела дефициты симультанности в переработке информации (в большей степени зрительно-пространственной), т.е. соответствовала варианту старения с ограничениями в уровне функционирования 2-го блока мозга (зона ТРО правого полушария).

Таким образом, возрастное когнитивное снижение, связанное с дисфункцией 1-го и 2-го блоков мозга, не характеризовалось прогредиентностью. Констатация стабилизации состояния пациентов является важным основанием для реализации абилитационных программ психологической поддержки и сопровождения. Этих пожилых людей достаточно информировать о «слабых» звеньях ВПФ и предложить им стратегии ауторегуляции и смыслового наполнения жизни на фоне поддерживающей фармакотерапии.

Иная картина имела место во второй подгруппе (40,7%), где уже при первом нейропсихологическом обследовании выявлялись симптомы, указывающие на импульсивность при решении арифметических задач и в целом снижение контроля за деятельностью и ее произвольной регуляцией (при выполнении проб на динамический праксис и проб «реакция выбора»). У 18,5% пациентов второй подгруппы наблюдалась явная дефицитарность со стороны лобных систем мозга (тенденция к персеверациям и полевому поведению).

Вторая часть этой подгруппы (22,2%) при первичном обследовании обнаруживала в сочетании симптомы дисфункции 1-го и 3-го блоков мозга (модально-неспецифическое снижение памяти, обусловленное повышенной тормозимостью следов при отсроченном воспроизведении, колебания продуктивности деятельности, сокращение или потеря программы начатого действия, импульсивность при выполнении проб «реакция выбора», снижение контролирующей и регулирующей роли речи в построении программ движений и действий). В этой подгруппе 4-летний период жизни пациентов, несмотря на поддерживающую терапию, характеризовался нарастанием не только ранее выявленных симптомов, но и общим когнитивным снижением и социальной дезадаптацией. Четырем из этих пациентов на момент второго обследования был поставлен диагноз болезни Альцгеймера.

Данные синдромного анализа нарушений ВПФ у лиц с MCI позволяют говорить о том, что сочетание симптомов со стороны глубинных и лобных структур мозга является неблагоприятным прогностическим признаком, свидетельствующим о дальнейшем нарастании мнестико-интеллектуального дефицита. В отношении лиц с синдромом MCI амнестического типа, имеющих указанные клинические характеристики, должны применяться дополнительные методы исследования и методы фармакологического и нефармакологического терапевтического воздействия, аналогичные тем, которые рекомендованы для пациентов с БА.

5. Выводы

1. Полученные данные позволяют рассматривать пожилых пациентов с синдромом MCI-носителей генотипа ApoE4(+), имеющих признаки сенильноподобного характерологического сдвига в структуре синдрома, оценку по шкале MMSE <27 баллов, а также снижение показателей по психометрическим тестам (FAB, CDT и «Звуковые ассоциации») как группу максимального риска по развитию деменции, обусловленной БА, или как пациентов с предементной стадией БА.

2. Нейропсихологическая оценка сочетания симптомов со стороны глубинных и лобных структур мозга указывает на высокий риск прогрессирования мнестико-интеллектуального снижения у пациентов с синдромом MCI.

3. По отношению к пациентам, имеющим указанные характеристики синдрома MCI и относящимся, следовательно, к группе высокого риска по БА, по-видимому, должны применяться те же терапевтические и коррекционно-реабилитационные подходы, что и к больным с БА.

4. Полученные данные о частоте и характере нарушений когнитивного и некогнитивного спектра у родственников 1 степени родства пациентов с БА и у лиц, имеющих указанные выше характеристики синдрома MCI, могут быть положены в основу выделения групп высокого риска по БА, которые должны в дальнейшем подвергаться диагностическому обследованию с применением более точных, но и более дорогостоящих высокотехнологичных или инвазивных методов. Эти же группы лиц следует рассматривать как объект для поиска биомаркеров, позволяющих диагностировать БА на предементном (или даже асимптоматическом) ее этапе, не прибегая к травматичным или высокозатратным нейровизуализационным обследованиям. Определение диагностических биомаркеров, в свою очередь, позволит создать диагностический инструмент, доступный для проведения массовых скринингов населения.

6. Превентивные терапевтические подходы: отечественный опыт

Методы первичной и вторичной превентивной терапии БА начали разрабатываться еще с конца прошлого столетия и за прошедшие 15 лет их методология претерпела значительные изменения как в плане совершенствования критериев выбора исследуемых популяций, так и по методам оценки полученных результатов (Green, DeKosky, 2006). В течение последнего десятилетия неоднократно предпринимались попытки применения различных медикаментозных средств с предполагаемым болезнь-модифицирующим эффектом, вносились изменения и в дизайн исследований (табл. 3).

К сожалению, ни одно из исследований не дало достоверного подтверждения эффективности проведенной терапии. Выполненные позднее проспективные исследования превентивной эффективности медикаментозных препаратов, зарегистрированных FDA и широко применяющихся для лечения БА (донепезил, ривастигмин, галантамин), у лиц с синдромом MCI также не дали достоверного подтверждения наличия у этих препаратов превентивного эффекта, т.е. возможности предупредить или замедлить развитие деменции.

Анализ применявшихся до сих пор методов превентивного терапевтического воздействия показал, что в подавляющем большинстве случаев цели терапии были направлены на блокирование тех или иных патогенетических звеньев БА или на уменьшение последствий уже начавшейся нейродегенерации. Вместе с тем попыток воздействия на систему внутренней защиты и восстановления мозга до настоящего времени не предпринималось.

Таблица 3

Клинические исследования превентивной терапии БА, по (Green, DeKosky, 2006)

Исследование	Препарат	Критерии включения	Число включенных лиц	Планируемая длительность исследования	Текущее состояние	Измерения исхода	Результаты
ADAPT	Целекоксиб, напроксен	Возраст≥70, Родственники 1 степени родства больных БА	2496	7-10 лет	Остановлено	Переход в деменцию и когнитивное снижение	Нет данных
GEM	Ginkgo biloba extract	Асимптоматические пожилые люди ≥75лет	500	5-7 лет	Продолжается	Переход в деменцию и когнитивный дефицит	Нет данных
HERS	Эстрогены, прогестерон	Асимптоматические женщины, средний возраст 67лет	1063	4,2 года	Завершено	Ухудшение по когнитивным тестам	Один тест улучшился
Heart Prote-ction Study	Vit E, C и бетакаротин	Асимптоматические с кардиоваскулярными ФР в возрасте 40-80 лет	20536	5 лет	Завершено	Случаи деменции	Нет различий между леченными и нелеченными
PREADVISE	Селен, Vit E	Асимптоматические мужчины ≥ 60 лет	10400	12 лет	Завершено	Случаи деменции и когнитивное снижение	Нет данных
WHIPERT	Эстроген и прогестин	Женщины без деменции 65-80 лет	2497	5 лет	Завершено	Случаи деменции и MCI и динамика по когнитивным тестам	Отрицательные результаты в леченной группе
Heart Protection Study	Симвастатин	Асимптоматические с кардиоваскулярными ФР в возрасте 40-80 лет	20536	5 лет	Завершено	Когнитивные тесты	Нет различий между лечебными группами
GUIDAGE	Ginkgo biloba extract	Субъективные жалобы на память, возраст 70 лет	2600	4 года	Продолжается	Случаи деменции	Нет данных
PHS-11	Vit E, фолиевая кислота, бетакаротин	Асимптоматические, > 65 лет	10000	9 лет	Продолжается	Телефонное когнитивное тестирование	Нет данных

Эндогенная система защиты мозга включает ряд естественных нейробиологических процессов: нейропротекцию, нейротрофическую регуляцию, нейропластичность и нейрогенез, обеспечивающих выживаемость нейронов в условиях воздействия тех или иных патогенных факторов. Под нейропротекцией понимают всю совокупность механизмов, направленных против повреждающих факторов. Нейропластичность обеспечивается за счет роста аксонов (спраутинга), образования новых синаптических связей между нейронами с реорганизацией работы головного мозга для замещения сохранными нейронами утраченных функций поврежденных мозговых структур. Нейрогенез обеспечивается активным образованием нейронов и клеток глии из клеток-предшественников.

В естественных условиях упомянутые компоненты эндогенной системы защиты и восстановления мозга регулируются естественными нейротрофинами: NGF, BDNF и др. Нейротрофины, в частности NGF, в последнее десятилетие стали весьма обнадеживающими кандидатами для лечения БА, поскольку было доказано, что сниженная нейротрофическая поддержка играет важную роль в патогенезе альцгеймеровской нейродегенерации. NGF предотвращает холинергическую дегенерацию после экспериментального повреждения ядер септогиппокампальных и базальных

отделов переднего мозга крыс и препятствует развитию у них когнитивных расстройств. Было проведено несколько клинических испытаний для исследования эффективности NGF при БА, но они потерпели неудачу. Поскольку NGF не может проникать через гематоэнцефалический барьер, было предпринято испытание с интрацеребровентрикулярным введением NGF, однако не было получено позитивных результатов, вероятно из-за инвазивного недифференцированного способа его введения (Гаврилова и др., 2008).

Церебролизин представляет собой ноотропный препарат, произведенный биотехнологическим методом с использованием стандартизированного расщепления протеинов очищенного головного мозга свиньи. Он состоит из 25% биологически активных пептидов с низким молекулярным весом и свободных аминокислот, которые могут проникать через гематоэнцефалический барьер, вызывая нейротрофическое действие на нейроны в периферической или центральной нервной системе. Основные компоненты нейропротективного действия церебролизина включают нейротрофическую регуляцию и повышенный транспорт глюкозы через гематоэнцефалический барьер, стимуляцию нейро- и синаптогенеза. Церебролизин сейчас широко используется в лечении деменции (сосудистой и альцгеймеровского типа), инсульта и черепно-мозговой травмы в более чем 30 странах.

В течение последних 20 лет было выполнено 7 двойных слепых плацебо-контролируемых исследований эффективности и безопасности инфузий церебролизина при БА на стадии мягкой–умеренной деменции (Гаврилова и др., 2000; Гомазков, 2011; Alvares et al., 2006; Bae et al. 2000; Ruether et al., 1994; Ruether et al., 2001), результаты которых подтвердили, с одной стороны, наличие достоверного симптоматического терапевтического ответа при хорошей переносимости, а с другой – пролонгированного терапевтического эффекта (на протяжении периода от 2 до 6 мес.) после окончания курса инфузий церебролизина. Наряду с этим были получены и новые экспериментальные данные, свидетельствующие о пролонгированных эффектах препарата в отношении нейропатологических проявлений БА: введение церебролизина уменьшает накопление амилоидных бляшек и синаптический дефицит у экспериментальных животных (Rockenstein et al., 2007).

Упомянутые результаты, а также полученные недавно доказательства участия механизмов нейропластичности, обеспечивающих компенсационный резерв мозга и сохранение когнитивных функций при уже начавшемся нейродегенеративном процессе, привели нас к предположению о целесообразности включения церебролизина в схему стандартной терапии БА, а также дали основание для использования его с целью предотвращения прогрессирования нейродегенеративного процесса на его предементном этапе, когда состояние пациента определяется синдромом MCI амнестического типа.

Результаты небольшого открытого клинического исследования эффективности церебролизина у больных с синдромом MCI, успешно выполненного в рамках пилотного проекта на группе из 50 больных, показали перспективность такого подхода и необходимость получения более надежных доказательств его эффективности для предотвращения или замедления перехода синдрома MCI в деменцию альцгеймеровского типа (Гаврилова и др., 2008).

С этой целью было предпринято трехлетнее проспективное сравнительное многоцентровое клиническое исследование, проводившееся в трех центрах: в отделе по изучению болезни Альцгеймера НЦПЗ РАМН, на кафедре нервных болезней Военно-медицинской академии и на кафедре неврологии, нейрохирургии и психиатрии Нижегородской медицинской академии (Гаврилова и др., 2010). В исследование были включены 110 пациентов в возрасте 60 лет и старше, рандомизированных в 2 группы: основную и контрольную, равные по численности и не различавшиеся по поло-возрастному распределению, по соотношению носителей и неносителей генетического фактора риска по БА – генотипа АроЕ 4(+) и по исходным оценочным параметрам когнитивного функционирования. Пациенты основной группы дважды в год получали курсовую инфузионную терапию церебролизином из 20 в/в инфузий по 30 мл в 100 мл изотонического раствора хлорида натрия. Пациенты контрольной группы получали с той же периодичностью винпоцетин (кавинтон) перорально по 15 мг/сут. Оценка эффективности терапии проводилась с помощью психометрической оценки с использованием набора из двух клинических шкал (MMSE и CDR) и батареи из 14 нейропсихологических тестов.

К окончанию трехлетнего периода наблюдения деменция альцгеймеровского типа была диагностирована у 12,7% пациентов контрольной группы и только у 3,8% лиц основной группы.

Сравнение динамики параметров когнитивного функционирования подтвердило эффективность церебролизина по сравнению с кавинтоном. Улучшение когнитивных функций по сравнению с исходной оценкой в основной группе наблюдалось по 10 из 14 тестов и шкал, в том числе в трех из них на статистически значимом уровне, тогда как в контрольной группе к окончанию исследования улучшились показатели по 6 тестам, большей частью на уровне незначимых минимальных значений. И напротив, ухудшение показателей установлено в контрольной группе по 6 тестам, тогда как в основной группе только по одному из них.

Таким образом, проведенное исследование обнаружило несомненный позитивный эффект трехлетней курсовой инфузионной терапии церебролизином в предотвращении (или замедлении) прогрессирования когнитивной недостаточности у лиц с синдромом MCI амнестического типа до деменции, обусловленной БА.

Безусловно, полученные данные требуют подтверждения в более масштабных двойных слепых плацебо-контролируемых рандомизированных проспективных исследованиях. Однако уже сейчас считаем целесообразным рекомендовать такую превентивную терапевтическую стратегию у лиц с наиболее высоким риском по БА – у родственников больных БА 1 степени родства с синдромом MCI амнестического типа и особенно у тех из них, которые имеют генетический фактор риска по БА – генотип АроЕ4 (+).

Изучение новых превентивных стратегий БА требует дальнейшего неотложного развития в рамках широкомасштабных многоцентровых проспективных клинических исследований с применением как церебролизина, так и новых терапевтических агентов с доказанным болезнь-модифицирующим потенциалом.

Литература

Алесенко А.В., Гаврилова С.И., Каратассо Ю.И., Федорова Я.Б., Тиганов А.С. Церамиды – потенциальные биомаркеры болезни Альцгеймера. Потенциальная роль сфинголипидов в нейропатогенезе болезни Альцгеймера // Психиатрия, 2014, в печати.

Гаврилова С.И. Фармакотерапия болезни Альцгеймера. М.: Пульс, 2003. 319 с.

Гаврилова С.И., Колыхалов И.В., Селезнева Н.Д. и др. Двойное слепое плацебо-контролируемое исследование влияния церебролизина на эффективность и переносимость последующей холинергической терапии болезни Альцгеймера // Журнал социальной и клинической психиатрии. 2000. № 2. С. 41-46.

*Гаврилова С.И., Федорова Я.Б., Колыхалов И.В. и др.*Терапевтический потенциал церебролизина в превентивной терапии болезни Альцгеймера // Журнал неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. 2008. № 8. С. 24-28.

Гаврилова С.И., Колыхалов И.В., Федорова Я.Б. и др. Возможности превентивной терапии болезни Альцгеймера: результаты 3-летнего проспективного открытого сравнительного исследования эффективности и безопасности курсовой терапии церебролизином и кавинтоном у пожилых пациентов с синдромом мягкого когнитивного снижения // Журнал неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. 2010. № 1. С. 68-75.

Гомазков О.А. Старение мозга и нейротрофическая терапия. М.: Икар, 2011. 180 с.

Калын Я.Б. Клиника инициальных проявлений и последующего течения сенильной деменции. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М., 1990. 25 с.

Коровайцева Г.И., Щербатых Т.В., Селезнева Н.Д. и др. Генетическая ассоциация между аллелями гена аполипопротеина Е (АроЕ) и различными формами болезни Альцгеймера // Генетика. 2001. Том 37. № 4. С. 529-535.

Корсакова Н.К., Балашова Е.Ю., Рощина И.Ф. Экспресс-методика оценки когнитивных функций при нормальном старении // Журнал неврол. и псих. им. С.С.Корсакова. 2009. № 2. С. 44-50.

Лурия А.Р. Высшие корковые функции человека и их нарушение при локальных повреждениях мозга. 1-е изд. М.: МГУ, 1962; 2-е изд. 1969. 3-е изд. М.: Академ. проект, 2000.

Лурия А.Р. Основы нейропсихологии. М.: МГУ, 1973.

Наливаева Н.Н., Журавин И.А., Тернер Э.Дж. Молекулярные основы патогенеза болезни Альцгеймера // Нейродегенеративные заболевания. Фундаментальные и прикладные аспекты. Ред. М.В. Угрюмов. М.: Наука, 2010. С. 253-285.

Райгородский Д.Я. Практическая психодиагностика. Методики и тесты. М.: Бахрах-М., 2011.

Рощина И.Ф., Жариков Г.А. Нейропсихологический подход в диагностике мягкой деменции у лиц пожилого и старческого возраста // Журнал неврол. и псих им. С.С. Корсакова. 1998. № 2. С. 34-40.

Селезнева Н.Д. Сравнительно возрастные особенности клиники и течения болезни Альцгеймера. Автореф. дисс. канд. мед. наук. М., 1990. 28 с.

Селезнева Н.Д., Рощина И.Ф., Гаврилова С.И. и др. Психические нарушения когнитивного и некогнитивного спектра у родственников 1 степени родства пациентов с болезнью Альцгеймера // Журнал неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. 2012. Т. 112. № 10. С. 8-13.

Селезнева Н.Д., Гаврилова С.И., Рощина И.Ф., Коровайцева Г.И. APOE-генотип и психические нарушения когнитивного и некогнитивного спектра у родственников 1-й степени родства пациентов с болезнью Альцгеймера // Психиатрия. 2013. Вып. 1. № 57. С. 13-23.

Федорова Я.Б. Синдром мягкого когнитивного снижения: психопатологическая структура и параклинические (психометрические, нейроинтраскопические и молекулярно-генетические) характеристики // Психиатрия. 2006. № 4. С. 60-68.

Alvares X.A., Cacabelos R., Laredo M., et al. A 24 week, double-blind placebo-controlled, multicentre study of three dosages of Cerebrolysin for patients with mild to moderate Alzheimer's disease // Eur. J. Neurol. 2006. Vol. 13. № 1. P. 43-54.

Alzheimer Disease International: World Alzheimer Report. 2011.

Backman L., Jones S., Berger A.K., Laukka E.J., Small B.J. Cognitive impairment in preclinical Alzheimer's disease: a meta-analysis // Neuropsychology. 2005. Vol. 19. P. 520-531.

Bae C.Y., Cho C.Y., Cho K. et al. A double-blind placebo-controlled, multicentre study of Cerebrolysin for Alzheimer's disease // J. Am. Geriatr. Soc. 2000. Vol. 48. № 12. P. 1566-1571.
Bazenet C., Lovestone S. Plasma biomarkers for Alzheimer's disease: much needed but tough to find // Biomarkers Med. 2012. Vol. 6. № 4. P. 441-454.
Caselli R.J., Reiman E.M., Osborne J.G. et al. Longitudinal changes in cognition and behavior in asymptomatic carriers of the APOE e4 allele // Neurology. 2004. Vol. 62. P. 1990-1995.
Cupples L.A., Farrer L.A., Sadovnick A.D. et al. Estimating risk curves for first-degree relatives of patients with Alzheimer's disease: the REVEAL study // Genet. Med. 2004. Vol. 6. P. 192-196.
Dubois B., Slachevsky A., Litvan I., Pillon B. A frontal assessment battery at bedside // Neurology. 2000. Vol. 55. P. 1621-1626.
Elias M.F., Beiser A., Wolf P.A., Au R., White R.F., D'Agostino R.B. The preclinical phase of Alzheimer disease: a 22-year prospective study of the Framingham Cohort // Arch. Neurol. 2000. Vol. 57. P. 808-813.
Folstein M., Folstein S., McHugh P.R. Mini-mental state: a practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician // J. Psychiatr. Res. 1975. Vol. 12. P. 189-198.
Green R.C., DeKosky S.T. Primary prevention in Alzheimer's disease. Prevention trials in the field of Alzheimer's disease. Ed. B.Vellas, L. Thal. // Neurology. 2006. Vol. 67. № 9. Suppl. 3. P. 82-85.
Hachincki V. et al. Multi-infarct dementia, a cause of mental deterioration in the elderly // Lancet. 1974. Vol. 2. P. 837-855.
Hamilton M. The assessment of anxiety states by rating // Br. J. Med. Psyhol. 1959. Vol. 32. P. 50-55.
Hamilton M. A rating scale for depression // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1960. Vol. 23. P. 56-62.
Jack C.R. et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of Alzheimer's pathological cascade // Lancet. Neurol. 2010. Vol. 9. № 1. P. 119-128.
Jack C. R.Yr., Albert M., Knopman D.S. et al. Introduction to revised criteria for diagnosis of alzheimer's disease: National Institute on aging and the alzheimer association workgroups // Alzheimer's Dement. 2011. Vol. 7. № 3. P. 257-262.
Jarvik L.F., La Rue A., Gokhman I. et al. Middle-aged children of Alzheimer parents, a pilot study: stable neurocognitive performance at 20-year follow-up // J. Geriatr. Psychiatry. Neurol. 2005. Vol. 18. P. 187-191.
Jayadev S., Steinbart E.J., Chi Y-Y. et al. Conjugal Alzheimer disease // Arch. Neurol. 2008. Vol. 65. № 3. P. 373-378.
Johnson S.C., La Rue A., Hermann B.P. et al. The effect of TOMM 40 poly-T length on grey matter volume and cognition in middle-aged persons with APOE epsilon3/epsilon3 genotype // Alzheimer's and dementia. 2011. Vol. 7. P. 456-465.
Kaplan E. H., Goodglass H., Weintraub S. The Boston Naming Test. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983.
Kawas C.H., Corrada M.M., Brookmeyer R. et al. Visual memory predicts Alzheimer's disease more than a decade before diagnosis // Neurology. 2003. Vol. 60. P. 1089-1093.
La Rue A., Hermann B., Jones J.E., Johnson S., Asthana S., Sager M.A. Effect of parental family history of Alzheimer's disease on serial position profiles // Alzheimers Dement. 2008. Vol. 4. № 4. P. 285-290.
Levy J.A., Bergeson J., Putnam K. et al. Context-specific memory and apolipoprotein E (APOE) epsilon 4: cognitive evidence from the NIMH prospective study of risk for Alzheimer's disease // J. Int. Neuropsychol. Soc. 2004. Vol. 10. P. 362-370.
Marilyn S.A., DeKoskyb S.T., Dicksond D., Duboise B. et al. The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging – Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease // Alzheimers Dement. 2011. Vol. 7. № 3. P. 270-279. doi:10.1016/j.jalz.2011.03.008).
McKhann G. et al. Clinical diagnosis of Alzheimer's disase: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under auspices of Departament of Health and Human Services Task Forse on Alzheimer's deseace // Neurology. 1984. Vol. 146. P. 939-944.
Morris J.C. The clinical dementia rating (CDR). Current version and scoring rules // Neurology. 1993. Vol. 43. P. 2412-2414.
Payami H., Grimslid H., Oken B. et al. A prospective study of cognitive health in the elderly (Oregon Brain Aging Study): effects of family history and apolipoprotein E genotype // Am. J. Hum. Genet. 1997. Vol. 60. P. 948-956.

Petersen R.S. Aging, mild cognitive impairment, and Alzheimer's disease // Neurol. Clin. 2000. Vol. 18. № 4. P. 789-806.

Petersen R.C., Touchon J. Consensus on mild cognitive impairment // Research and Practice in Alzheimer's Disease, E.A.D.C./A.D.C.S. Joint Meeting. Paris: Serdi Publisher, 2005. Vol. 10. P. 24-32.

Reisberg B., Ferris S.H., de Leon M.J. et al. The global deterioration scale (GDS). An instrument for the assessment of primary degenerative dementia // Am. J. Psychiatry.1982: Vol. 139. P. 1136-1139.

Rockenstein E., Maute M., Adame A. et al. Effects of Cerebrolysin on neurogenesis in an APP transgenic model of double-blind placebo-controlled, multicentre study of Cerebrolysin for Alzheimer's disease // Acta Neuropathol. 2007. Vol. 113. № 3. P. 265-275.

Roses A.D. An inherited variable poly-T repeat genotype in TOMM40 in Alzheimer's disease // Archives of Neurology. 2010. Vol. 67. P. 536-541.

Ruether E., Ritter R., Apecechea M. et al. Efficacy of the peptidergic nootropic drug cerebrolysin in patients with senile dementia of the Alzheimer type // Pharmacopsychiatry. 1994. Vol. 27. № 1. P. 32-40.

Ruether E., Husmann R., Kinsler E. et al. A 28 week, double blind, placebo-controlled study with Cerebrolysin in patients with mold to moderate Alzheimer's disease // Int. Clin. Pharmacol. 2001. Vol. 16. № 5. P. 253-263.

Sager M.A., Hermann B., La Rue A. Middle-aged children of persons with Alzheimer's disease: APOE genotypes and cognitive function in the Wisconsin Registry for Alzheimer's Prevention // J. Geriatr. Psychiatry Neurol. 2005. Vol. 18. № 4. P. 245-249.

Shulman K.I., Shedletsky R., Silver I. The challenge of time: clock drawing and cognitive function in the elderly // Int. J. Geriatr. Psychiatr. 1986. Vol. 1. P. 135-140.

Small B.J., Herlitz A., Fratiglioni L. et al. Cognitive predictors of incident Alzheimer's disease: a prospective longitudinal study // Neuropsychology. 1997. Vol. 11. P. 413-420.

Small G.W., Ercoli L.M., Silverman D.H. et al. Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 6037-6042.

Snowdon D.A., Kemper S.J., Mortimer J.A., Greiner L.H., Wekstein D.R., Markesbery W.R. Linguistic ability in early life and cognitive function and Alzheimer's disease in late life findings from the Nun Study // JAMA. 1996. Vol. 275. P. 528-532.

Vos S.J.B., Xiong Ch., Visser P.J. et al. Preclinical Alzheimer's disease and its outcome: a longitudinal cohort study // 2013. Vol. 12. P. 957-965. www.thelancet.com/neurology.

Wechsler D. Wechsler Memory Scale manual. San Antonio, TX: Psychological Corporation, 1974.

Yesavage J.A., Brink T.L., Rose T.L. et al. Development and validation of a geriatric depression screening scale: A preliminary report // J. Psychiatric Res. 1983. Vol. 17. P. 37-49.

Стратегии поиска биомаркеров синдрома мягкого когнитивного снижения и болезни Альцгеймера

И.А. Журавин, С.И. Гаврилова, Я.Б. Федорова, Н.М. Дубровская, Д.И. Козлова, С.А. Плеснева, Н.Н. Наливаева

Содержание

1. Введение
2. Методологические подходы к поиску биомаркеров
3. Источники исследования биомаркеров
4. Потенциальные биомаркеры плазмы крови
5. Заключение

1. Ведение

Существующие в настоящее время подходы к диагностике болезни Альцгеймера (БА) позволяют надежно констатировать наличие этого заболевания только на стадии клинически выраженного слабоумия с применением тестирования интеллектуальных функций, включая память, с использованием MMSE (Mini-mental state examination) и ADAS-cog (Alzheimer's disease assessment scale-cognitive subscale) тестов (Waldemar et al., 2007; Velayudhan et al., 2014; Posner et al., 2013). Также диагноз БА подтверждается при посмертном выявлении в ткани мозга сенильных бляшек, состоящих из агрегированного амилоидного пептида (Aβ) и нейрофибриллярных клубков (образованных гиперфосфорилированным тау-белком), которые являются основными морфологическими признаками данного заболевания (McKhann et al., 2011), хотя не всегда их число соответствует тяжести развития деменции (Villemagne et al., 2011). Установлено, что с момента начала первичного нейродегенеративного процесса до первых клинических проявлений БА проходит не менее 20 лет и есть основания полагать, что новые методы терапии БА, которые в настоящее время находятся в стадии разработки, позволят существенно замедлить нейродегенеративные процессы и, соответственно, отодвинуть развитие слабоумия и связанной с ним инвалидизации больных. Однако этого можно достичь только в том случае, если лечение будет начато на доклинической стадии заболевания, в связи с чем особую актуальность приобретает разработка новых методов ранней доклинической диагностики БА, а также поиск надежных биомаркеров.

2. Методологические подходы к поиску биомаркеров

Помимо генетического анализа на наличие у пациентов уже установленных мутаций генов, ведущих к развитию пресенильной формы БА (см. с. 224–273), в настоящее время данные полногеномного поиска ассоциаций (Genome-Wide

Association Study – GWAS) предлагают также рассматривать в качестве возможных критериев предрасположенности к развитию старческой формы БА наличие мутаций целого ряда генов, список которых продолжает расти (Shi et al., 2012; Lambert et al., 2013; Miyashita et al., 2013; Escott-Price et al., 2014).

Другим методом ранней диагностики БА в настоящее время является прижизненное сканирование мозга с помощью медицинской нейровизуализации при помощи компьютерной магнитно-резонансной томографии (МРТ) и позитронно-эмиссионной томографии (Brown et al., 2014; Dennis, Thompson, 2014; Drzezga et al., 2014), позволяющих не только исследовать изменения объема и метаболизма разных участков мозга, но также выявлять и прижизненно анализировать число сенильных бляшек (Drzezga, 2010). С помощью этих методов были выявлены наиболее существенные изменения, коррелирующие со степенью развития деменции, в височных долях мозга (Chincarini et al., 2011), а также в гиппокампе пациентов с когнитивными нарушениями (Jack et al., 2010). Однако, несмотря на эффективность этих методов исследования, для них требуются дорогостоящее оборудование и высококвалифицированный облуживающий персонал, что снижает их доступность для массовых клинических исследований. В связи с этим поиск доступных молекулярных маркеров для ранней и надежной диагностики развития деменции и БА является первостепенной задачей исследователей. Особенно это важно для правильной диагностики на стадии мягкого когнитивного снижения (mild cognitive impairment, MCI или МКС) и оценки эффективности медикаментозного вмешательства, направленного на предотвращение развития БА. В настоящее время накоплено значительное число данных, свидетельствующих о наличии нейропатологических особенностей МКС, характеризующих его как раннюю стадию развития БА. К ним можно отнести такие показатели, как наличие определенного числа бляшек, нейрофибриллярных клубков, синаптический и нейротрансмиттерный дефицит, а также обусловленный этими явлениями уровень клеточной гибели (Haroutunian et al., 2009).

В настоящее время для диагностических целей и поиска биомаркеров МКС и БА разработан и применяется широкий спектр методов протеомики (рис.). Многие из них основаны на традиционных биохимических методах исследования (электрофорез, иммуноблоттинг, определение ферментативной активности). Также все большее значение приобретают новые высокочувствительные электроаналитические (основанные на использовании меченых соединений) и SPR-диагностические (основанные на явлении плазменного поверхностного резонанса) биосенсоры, которые могут в перспективе быть базой для создания средств проведения широкого спектра анализов (Yang et al., 2014).

Несмотря на наличие большого числа исследований, в недавно проведенном систематическом анализе имеющихся в литературе данных с привлечением когорты исследователей из разных стран мира (Ritchie et al., 2014), было показано, что многие из предлагаемых биомакеров пока не являются достаточно убедительными диагностическими критериями. Даже определение такого важного показателя, как содержание Aβ в плазме крови с применением самых чувствительных на сегодняшний день методов, не может служить окончательным диагностическим

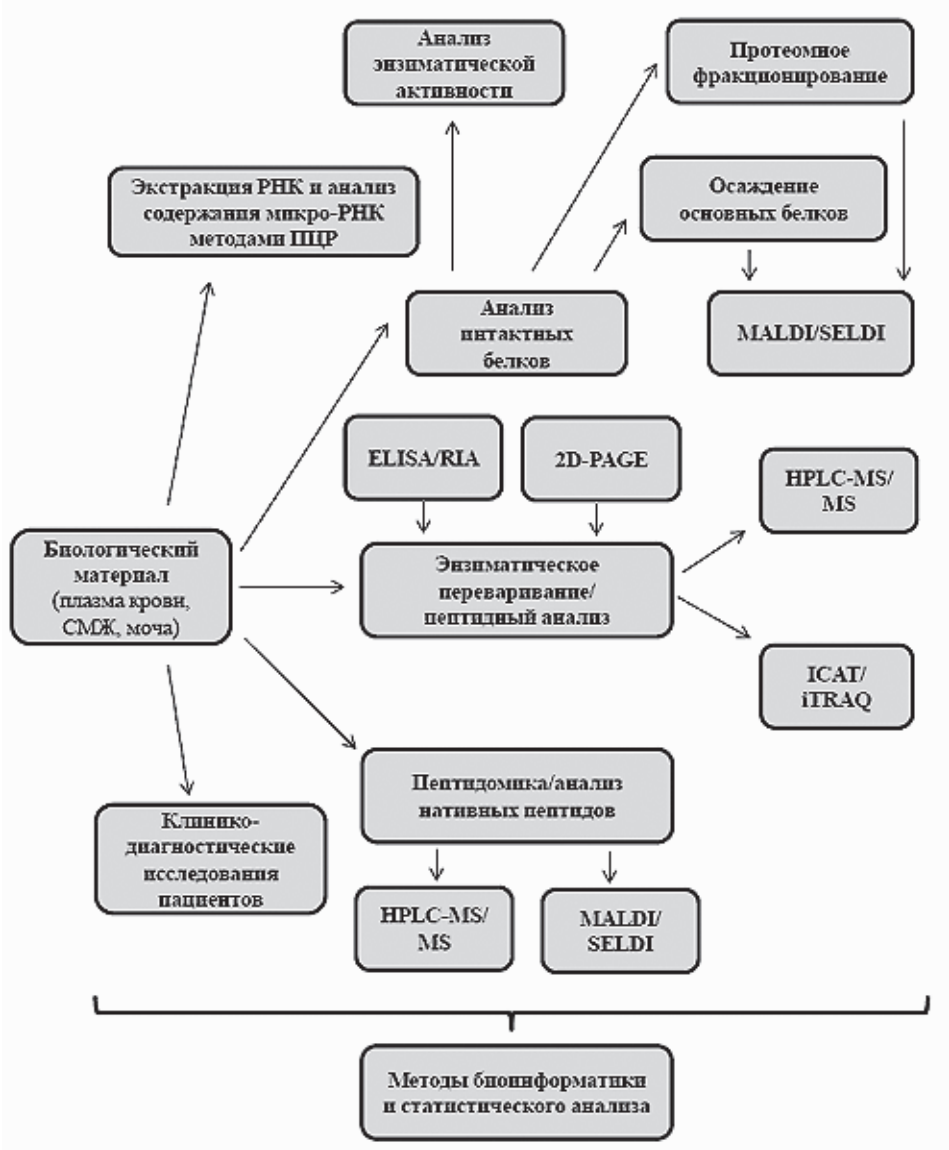


Рис. Основные потенциальные стратегии для поиска и анализа возможных биомаркеров

Образцы биологического материала могут быть проанализированы при помощи большого числа современных методов. Они включают в себя анализ интактных белков традиционными методами электрофореза в ПААГ (как одно-, так и двумерного, 2D), иммуноблотинга, иммунопреципитации (ELISA), радиоиммунными методами (RIA) или с использованием более современных анализаторов, основанных на матрично-активированной (MALDI) или поверхностно-усиленной (SELDI) лазерной десорбции/ионизации. Крупные белки также могут быть расщеплены на более мелкие пептидные фрагменты, которые подвергаются масс-пектрометрическому анализу или негелевому анализу с использованием стабильных изотопов (ICAT и iTRAQ). Анализ РНК, изолированной из биологического материала может быть проанализирован как на содержание мРНК, так и микро-РНК методами качественной и количественной ПЦР (qRT-PCR). Наличие корреляции между биохимическими данными и дигностическими критериями, полученными при клинических исследованиях пациентов, обрабатываются методами биоинформатики и статистического анализа. (Адаптировано из Dudley et al., 2011)

критерием для прогноза перехода МКС в БА. Более того, метаанализ существующих в литературе данных свидетельствует, что все исследования по применимости того или иного критерия в качестве биомаркера не являются достаточно объемными или законченными, и в них часто отсутствует важная информация, необходимая для корреляционных вычислений, что делает острой необходимость стандартизировать и развивать более четкие методологические и технические подходы к проведению и обобщению результатов таких исследований (Noel-Storr et al., 2013).

3. Источники исследования биомаркеров

Существующие в настоящее время данные клинических исследований и литературы свидетельствуют, что некоторые биохимические показатели спинномозговой жидкости (СМЖ) убедительно коррелируют с уровнем развития БА (Frankfort et al., 2008). К их числу относятся содержание $A\beta_{1-42}$ и $тау_{181}$, поскольку их комбинированный анализ приближает правильность диагностических критериев к 90%, что делает их незаменимыми дополнительными параметрами для постановки правильного диагноза (Maddalena et al., 2003; Maccioni et al., 2004). Тем не менее, эти показатели не всегда позволяют четко различать такие патологии, как БА и деменция с тельцами Леви (DLB), которая является вторым по частоте встречаемости нейродегенеративным заболеванием (Slaets et al., 2013). Имеются данные, что повышенная иммунореактивность СМЖ к фактору роста нервов (NGF-like immunoreactivity) также коррелирует с развитием у пациентов БА (Marksteiner et al., 2008). Несмотря на потенциальную значимость показателей СМЖ для диагностики, значительные ограничения их применимости на начальных этапах клинического тестирования или широкого скриннинга обусловлены инвазивностью люмбальной пункции. В плане применения маркеров СМЖ для дифференциальной диагности МКС и БА такие факторы, как отсутствие четкого клинического диагноза, недостаточность сроков наблюдения за пациентами с МКС, более низкая аккуратность проведения тестирования памяти в поликлиниках по сравнению со специализированными клиниками, а также вариабельность методических подходов, являются лимитирующими. Тем не менее, проведение более длительных и диагностически адекватных комплексных исследований с применением предлагаемых в настоящее время основных биомаркеров СМЖ может привести к созданию более надежных диагностических и прогностических тестов для оценки хода развития заболевания и его лечения (Ferreira et al., 2014).

По сравнению с процедурами томографии и любальной пункции забор крови для клинических исследований является наиболее приемлемым и менее дорогостоящим. Этим обусловлено наличие большого числа исследований, направленных на выявление биомаркеров МКС и БА в плазме крови, результаты которых предполагают, что ряд соединений плазмы могут иметь потенциальную диагностическую ценность (Lista et al., 2013), однако многие из них отражают лишь наличие вторичных патологических процессов (например воспаления), вызванных нейродегенерацией. Более того, наличие сопутствующих заболеваний у пациентов

с деменцией является результатом того, что многие из исследованных параметров довольно трудно воспроизводимы (Björkqvist et al., 2013). Этим объясняется тот факт, что до сих пор не предложен ни один надежный показатель анализа состояния плазмы крови для постановки диагноза МКС и установления риска его перехода в БА.

В качестве источника менее вариабельных маркеров в настоящее время рядом авторов предлагается использовать тромбоциты, которые, по мнению исследователей, отражают перестройки на клеточном уровне, сходные с нейрональными (Talib et al., 2012). Так, было показано, что метаболизм предшественника амилоидного пептида (APP) в тромбоцитах при БА изменяется так же, как и в нейронах, при этом ускоряются амилоидогенные процессы, приводящие к образованию и накоплению Aβ (Tang et al., 2006). Еще одним показателем метаболизма тромбоцитов, который ряд авторов связывает с центральными нарушениями при БА, является снижение в них содержания серотонина за счет недостатка его транспорта (Spigset et al., 2000; Prokšelj et al., 2014), однако эти данные не всегда являются воспроизводимыми. К числу других показателей нарушений в тромбоцитах, которые предположительно могут быть связаны с БА, относят уровень гиперфосфорилированного тау-белка, киназы гликоген-синтазы 3β, накопление NO и продуктов перекисного окисления, а также активности моноаминооксидазы и фосфолипазы А (Veitinger et al., 2014). Однако многие из них не являются специфическими характеристиками БА и корреляция их изменений при развитии МКС и БА еще нуждается в подтверждении.

К числу других тромбоцитарных маркеров развития БА можно отнести цитохром с-оксидазу (ЦО), активность которой в митохондриях клеток мозга при БА существенно снижена (Manczak et al., 2004). Поскольку ген ЦО подвержен системной регуляции в организме человека, «дефект» ЦО также обнаруживается при БА и в тромбоцитах крови (Cardoso et al., 2004). К числу ферментов, связанных с патогенезом БА и представляющих интерес для клиницистов, также относятся глутаматдегидрогеназа (ГД) и глутаминсинтетаза (ГС), обеспечивающие баланс возбуждающего нейротрансмиттера глутамата. В лаборатории нейрохимии НЦПЗ РАМН было обнаружено, что в мозге человека присутствуют как минимум два фермента (один из этих ферментов идентифицирован по аминокислотной последовательности как аналог глутаминсинтетазы – ГС, а второй назван белком, подобным ГС – ГСПБ) (Boksha et al., 2002; Burbaeva et al., 2005; Бурбаева и др., 2012). Эти ферменты обладают *in vitro* одинаковой способностью катализировать трансферазную реакцию, используемую в рутинных анализах для определения активности ГС – ключевого фермента глутамат/глутаминового цикла. Предположительно изменения количества ГСПБ как элемента системы метаболизма глутамата, нарушающегося задолго до проявления БА, носят системный характер и количество этого белка аномально повышено не только в мозге, но и в тромбоцитах периферической крови больных. При определении активности ЦО было показано, что тромбоцитарная активность этого фермента в группах пациентов с МКС и БА статистически достоверно снижена по сравнению с контролем. Более того, в тромбоцитах плазмы крови у пациентов этих групп содержание ГСПБ также было статистически достоверно изменено по сравнению с контролем, тогда как

количество ГД было на границе достоверности. Это дает основание полагать, что данные биохимические параметры с определенной степенью достоверности могут быть прогностическими маркерами развития патологии.

Поскольку воспалительные процессы часто сопутствуют нейродегенеративным заболеваниям, поиск корреляции между изменением формулы крови и критериями, характеризующими степень развития МКС и БА, также представляет определенный интерес. Такого рода исследования свидетельствтвуют, что уровень моноцитов и нейтрофилов у пациентов с диагностированной БА независимо от пола и возраста существенно выше, чем в контрольной группе, в то время как уровень лимфоцитов и базофилов достоверно снижен (Shad et al., 2013). Повышенный уровень моноцитов и нейтрофилов свидетельствует о наличии хронического воспаления, которое может быть предпосылкой развития БА, в то время как снижение продукции лейкоцитов обуславливает недостаточную способность организма противостоять инфекциям. Низкий уровень базофилов в свою очередь указывает на их истощение в результате хронической аллергической реакции. Изучение продуктов, вырабатываемых лейкоцитами, в частности цитокин TNFα, а также моноцитами (IL-1 и IL-12), могут быть важными критериями для многофакторного прогнозирования риска развития БА. В дополнение к этим критериям недавно было показано, что уровень экспрессии трансмембранного гликопротеина CD33 (лектин, также известный как Siglec-3, принимающий участие в регуляции клеточного ответа) на поверхности моноцитов и макрофагов отражает предрасположенность к развитию БА и может служить в качестве маркера ранних изменений, приводящих к этому заболеванию (Bradshaw et al., 2013).

Одним из источников биологического материала, удобных для сбора в поликлинических условиях и для поиска биомаркеров БА, является моча. Данные литературы свидетельствуют, что содержание ряда белков в моче пациентов с БА существенно изменено. Так, уровень содержания нейронального мембраносвязанного фосфорилированного белка (Neural Thread Protein, NTP) был существенно выше в моче пациентов с дигностированной БА по сравнению с контролем и другими нейродегенеративными заболеваниями, в частности болезнью Паркинсона (Youn et al., 2011). Более того, в моче также определяется широкий спектр коротких некодирующих микро-РНК (Cheng et al., 2013), которые в настоящее время приобретают все более важную роль как в фундаментальных научных исследованиях, так и в диагностической практике, и уже есть исследования, свидетельствующие о наличии специфических изменений их состава при БА (Lukiw et al., 2013) и МКС (Sheinerman et al., 2013).

Еще одним объектом для поиска биомеркров являются клетки эпителия ротовой полости, которые в настоящее время широко используются для анализа ДНК в криминологии или при установлении отцовства. Сравнительно легкий способ забора этого материала, а также слюны пациентов может сделать их удобными объектами для скриннинга большого числа молекул и ферментов, в том числе для диагностики МКС и БА (François et al., 2014b). Так, в проведенном недавно исследовании с помощью лазерной сканирующей цитометрии были показаны различия в соотношении разного типа клеток в ротовой полости, содержания

в них ДНК и состава нейтральных липидов между пациентами с клинически установленными диагнозами МКС и БА по сравнению с соответствующими контролями по возрасту и полу (François et al., 2014a).

4. Потенциальные биомаркеры плазмы крови

Как уже было упомянуто ранее, плазма крови является наиболее оптимальным объектом для широкого скриннинга биологических показателей как при профилактических осмотрах в поликлиниках, так и у пациентов в стационарах, что позволяет проведение систематических исследований на протяженном периоде времени. Однако периферическая кровь и выделенная из нее плазма также являются сложными биологическими образованиями, содержащими белки, берущими начало из разных органов, что часто снижает их специфичность для диагностики поражений мозга. В частности, уровень содержания Аβ колеблется в плазме крови в довольно широком диапазоне вследствие его протеолитического расщепления ферментами печени, почек и самой крови, что не позволяет установить корреляцию между его содержанием и уровнем развития БА, хотя в ткани мозга этот показатель соответствует степени тяжести заболевания (Rissman et al., 2012). Тем не менее, появляющиеся данные все более убедительно свидетельствуют о том, что целый ряд белков и ферментов крови может служить в качестве биомаркеров МКС и БА (O'Bryant et al., 2010). В сравнительно недавнем комплексном анализе данных 21 исследования, проведенного с использованием широкого спектра методов протеомики, было выделено 163 потенциальных биомаркера, способных отражать характер и степень развития БА. Среди них в пяти независимых исследованиях было показано наличие корреляции с фенотипом БА у таких соединений, как α-1-антитрипсин, α-2-макроглобулин, аполипопротеин Е (АроЕ) и комплимент С3. В состав другой группы из 9 потенциальных биомаркеров были отнесены также молекулы, представляющие системы комплимента, сигнального каскада Toll-подобных рецепторов, рака мочевого пузыря, диабета 1 типа, прионы и т.д. (Kiddle et al., 2014). Некоторые из них были также идентифицированы при анализе 1001 белка из плазмы крови пациентов с БА, который добавил к предыдущему списку такие соединения, как специфический антиген рака предстательной железы, панкреатический прогормон (этот белок имеет прямое отношение к наличию атрофии энторинальной коры мозга при БА), кластерин и фетуин В (последний входит в суперсемейство ингибиторов сериновых протеаз) (Sattlecker et al., 2014).

В настоящее время патогенез спорадической формы БА тесным образом связывают с нарушениями в системе расщепления и выведения из ткани мозга излишков Аβ (Sagare et al, 2012). Согласно данным наших исследований, а также данным литературы, в нормально функционирующем мозге содержание Аβ определяется балансом между процессами его формирования и катаболизма. Показано, что некоторые металлопептидазы мозга, например неприлизин (НЕП), эндотелин-конвертирующий фермент и инсулин-деградирующий фермент (инсулиназа), способны расщеплять Ab, препятствуя его накоплению, что делает их важной мишенью в

терапии болезни Альцгеймера (Наливаева и др., 2008; Nalivaeva et al, 2012a,b). Содержание и активность НЕП в ткани мозга снижается с возрастом и при различных заболеваниях (Tikkanen et al., 1996; Wang et al., 2010). Литературные данные также свидетельствуют о том, что содержание мРНК НЕП и активность его гомолога НЕП2, который также способен расщеплять Ab, снижаются в головном мозге пациентов с МКС и БА в средне-височной и средне-лобной извилинах, хвостатом ядре и мозжечке (Huang et al., 2012). На периферии активность НЕП наиболее высока в почках, а также в плазме, что делает его удобным объектом для клинических исследований. Было высказано предположение, что уровень Аβ в плазме регулирует его выведение из мозга по периваскулярным путям вследствие существующего баланса его содержания в мозге и на периферии (Liu et al., 2010). Из этого следует, что дефицит активности НЕП в плазме будет приводить к повышению в ней содержания Аβ, снижению его транспорта из мозга в кровь и накопление этого пептида в ткани мозга. Чтобы проверить это предположение, нами было проведено исследование уровня активности НЕП у пациентов с амнестическим типом МКС (аМКС) и БА, которые наблюдались в отделении болезни Альцгеймера и ассоциированных с ней расстройств отдела гериатрической психиатрии ФГБУ «НЦПЗ» ФАНО, а также у пожилых людей, не имеющих нарушений когнитивных функций (табл.).

Пациенты из группы аМКС соответствовали современным критериям диагностики в соответствии с международным протоколом (Petersen, 2003). Для постановки этого диагноза необходимо наличие совокупности ряда критериев, включающих жалобы больного на снижение памяти, подтверждаемые информантом, выраженность когнитивного дефицита в рамках параметров двух шкал: соответствие 3-й стадии по шкале общего ухудшения когнитивных функций (Global Deterioration Scale – GDS) и оценка 0,5 по шкале тяжести деменции (Clinical Dementia Rating – CDR). При этом повседневная деятельность пациентов должна оставаться сохранной, хотя возможно легкое ухудшение в наиболее сложных видах повседневной и/или профессиональной активности. Пациенты из группы БА характеризовались выраженным нарушением когнитивных функций и повседневного функционирования, свидетельствующим о том, что изменения в ЦНС уже являются необратимыми и сопровождаются нарушениями в различных медиаторных системах, в метаболических путях нервной ткани и массовой гибелью клеток. Согласно современным представлениям, при развитии деменции каждый пациент проходит «промежуточ-

Таблица

Характеристики пациентов, принявших участие в исследовании, и показатели их когнитивных способностей

Диагноз	Тип заболевания	Этап заболевания	Количество пациентов	Средний возраст	MMSE	ADAS
БА	сенильный	умеренная деменция	19	72,12±3,31	19,87±5,16	30,12±16,11
аМКС	амнестический	без деменции	20	69,0±9,65	27,75±0,78	2,0±0,0
Контроль			14	59,13±7,52	30,0±0,0	1,0±0,0

ную» (додементную) стадию – начальных когнитивных расстройств, не достигающих уровня деменции, которая с большой степенью вероятности может перейти в БА или иную деменцию (Яхно, 2006; Гаврилова и др., 2010; Petersen et al., 2001).

Анализ активности НЕП в плазме крови пациентов проводили с использованием флуорисцентного энзиматического метода (Fisk et al., 2007). Полученные данные показали, что активность НЕП в плазме крови пациентов с аМКС ниже активности этого фермента у пациентов без нарушений внимания и памяти (Журавин и др., 2011). У пациентов с диагнозом БА активность неприлизина в плазме крови была снижена по отношению к двум первым группам в среднем на 8%. Несмотря на то что снижение активности НЕП в плазме было сравнительно невелико, постоянный дефицит этого фермента в течение длительного времени может приводить к существенному изменению баланса метаболизма и накоплению Аβ в ткани мозга, что является основой развития нейродегенеративных изменений.

При развитии деменции и БА существенным образом страдает холинергическая система мозга (Schifilliti et al., 2010). Из литературных данных известно, что активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и бутирилхолинэстеразы (БХЭ) снижается в СМЖ пациентов с БА (Appleyard, McDonald, 1992), а в коре головного мозга снижается соотношение активности АХЭ и БХЭ (Arendt et al., 1992). Однако исследований активности данных ферментов в плазме крови как наиболее доступном для исследования клиническом материале при МКС и БА пока не проводилось. В этой связи нами был проведен анализ активности АХЭ и БХЭ в плазме пациентов из перечисленных выше групп с использованием метода Эллмана в разработанной нами модификации (Наливаева и др., 2011). Полученные данные свидетельствуют о том, что активность БХЭ в плазме крови пациентов с диагнозом аМКС достоверно (в среднем на 9%) ниже активности данного фермента в контрольной группе (184,80±3,28 и 175,40±3,16 пмолей субстрата/мг белка в мин, соответственно). Активность БХЭ в плазме крови пациентов с БА снижена по сравнению с аМКС на 16% и контролем на 22%. Аналогичные изменения были продемонстрированы и при исследовании активности АХЭ в тех же группах пациентов. Так, активность АХЭ в плазме крови пациентов с аМКС была снижена по отношению к контрольной группе на 9% (6,69±0,08 и 5,15±0,18 пмолей субстрата/мг белка в мин, соответственно), а в группе с диагностированной БА – на 22% (3,67±0,17 пмолей субстрата/мг белка в мин). Слабо выраженное снижение активности АХЭ и БХЭ в плазме крови пациентов с аМКС может быть объяснено тем, что у пациентов данной группы патологические изменения еще не достигают степени тяжести деменции и являются обратимыми, в то время как у пациентов с выраженной БА уже наступили необратимые метаболические изменения, приводящие в том числе к нарушению функционирования ферментов различных медиаторных систем.

Лечение пациентов обеих групп нейропротективным препаратом цераксон (Гаврилова и др., 2011а) приводило к повышению активности как АХЭ, так и БХЭ в среднем на 12% по отношению к группе аналогичных пациентов, получавших плацебо. Известно, что данный препарат эффективен при лечении когнитивных нарушений как нейродегенеративной, так и сосудистой этиологии, и показатель активности АХЭ и БХЭ у пациентов отражает позитивную динамику действия

данного препарата, соответствующую улучшению их когнитивных показателей, связанных с холинэргической передачей, в том числе памяти (Гаврилова и др., 2011б). Применение препарата цераксон также приводило к достоверному повышению активности НЕП в плазме крови пациентов с аМКС до контрольных величин.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что уровень активности АХЭ, БХЭ и НЕП может потенциально служить преклиническим маркером МКС и БА и использоваться для прослеживания динамики развития и эффективности использования терапевтических препаратов.

5. Заключение

В связи с важностью поиска надежных биомаркеров ранних стадий развития БА и дифференциальной диагностики синдрома МКС, а также создания удобных и недорогих тестов для их широкого практического применения необходимо учитывать, что любые предлагаемые молекулярные характеристики должны пройти глубокое и всестороннее тестирование с использованием как можно больших когорт пациентов с четко установленным диагнозом, а также фено- и генотипированием. Такие исследования требуют координации усилий специалистов из разных областей науки и медицины. Несомненно, уже есть предпосылки для создания тестов с использованием ряда биомаркеров, которые могут быть использованы в пилотных исследованиях в самом недалеком будущем, однако перспектива их широкого применения в большой степени зависит от успеха фундаментальных исследований и развития программ их финансирования на государственном и международном уровнях.

Литература

Бурбаева Г.Ш., *Бокша И.С., Савушкина О.К., и др.* Активность тромбоцитарной цитохром с-оксидазы и количество фермента метаболизма глутамата при синдроме мягкого когнитивного снижения // Журнал неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. 2012. Т. 112. № 2. С. 55-58.

Гаврилова С.И., *Левин О.С., Жданеева Л.В.* Неврологические нарушения при болезни Альцгеймера // Журнал неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. 2010. Т. 110. № 7. С. 4-8.

Гаврилова С.И., *Федорова Я.Б., Гантман М.В. и др.* Опыт клинического применения препарата Цераксон (цитиколин) в лечении синдрома мягкого когнитивного снижения // Психиатрия. 2011а. № 1. С. 45-51.

Гаврилова С.И., *Федорова Я.Б., Калын Я.Б. и др.* Цераксон (цитиколин) в лечении синдрома мягкого когнитивного снижения (Mild cognitive impairment) // Журнал неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. 2011б. Т. 111. № 12. С. 16-20.

Журавин И.А., Багрова Д.И., Гаврилова С.И и др. Исследование механизмов регуляции амилоид-деградирующих ферментов и их роли в патогенезе когнитивных расстройств // Нейрохимические подходы к исследованию функционирования мозга. Ростов-на Дону, 2011. С. 65-66.

Наливаева Н.Н., Беляев Н.Д., Тернер А.Дж. и др. Роль ферментов метаболизма амилоидного пептида в патогенезе деменции альцгеймеровского типа: поиск методов ранней диагностики и лечения // Психиатрия. 2008. № 4-6. С. 34-42.

Наливаева Н.Н., *Макова Н.З., Кочкина Е.Г. и др.* Влияние геропротекторных пептидов на активность холинэстераз и образование растворимой формы предшественника амилоидного пептида в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y // Нейрохимия. 2011. Т. 28. С. 200-207.

Яхно Н.Н. Когнитивные расстройства в неврологической практике // Невролог. журнал. 2006. № 1. С. 4-12.

Appleyard M.E., *McDonald B.* Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in cerebrospinal fluid from different levels of the neuraxis of patients with dementia of the Alzheimer type // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 1992. Vol. 55. P. 1074-1078.

Arendt T., *Brückner M.K., Lange M., Bigl V.* Changes in acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in Alzheimer's disease resemble embryonic development – a study of molecular forms // Neurochem. Int. 1992. Vol. 21. P. 381-396.

Björkqvist M., *Ohlsson M., Minthon L., Hansson O.* Evaluation of a previously suggested plasma biomarker panel to identify Alzheimer's disease // PLoS One. 2012. Vol. 7. P. e29868.

Boksha I.S., *Tereshkina E.B., Burbaeva G.S.* Glutamine synthetase and glutamine synthetase-like protein from human brain: purification and comparative characterization // J. Neurochem. 2000. Vol. 75. P. 2574-2582.

Bradshaw E.M., *Chibnik L.B., Keenan B.T. et al.* CD33 Alzheimer's disease locus: altered monocyte function and amyloid biology // Nat. Neurosci. 2013. Vol. 16. P. 848-850.

Brown R.K., *Bohnen N.I., Wong K.K. et al.* Brain PET in suspected dementia: patterns of altered FDG metabolism // Radiographics. 2014. Vol. 34. P. 684-701.

Burbaeva G.Sh., *Boksha I.S., Tereshkina E.B., et al.* Glutamate metabolizing enzymes in prefrontal cortex of Alzheimer's disease patients // Neurochem. Res. 2005. Vol. 30. P. 1443-1451.

Cardoso S.M., *Proença M.T., Santos S., Santana I., Oliveira C.R.* Cytochrome c oxidase is decreased in Alzheimer's disease platelets // Neurobiol. Aging. 2004. Vol. 25. P. 105-110.

Cheng L., *Quek C.Y., Sun X. et al.* The detection of microRNA associated with Alzheimer's disease in biological fluids using next-generation sequencing technologies // Front. Genet. 2013. Vol. 4. P. 150.

Chincarini A., *Bosco P., Calvini P. et al.* Local MRI analysis approach in the diagnosis of early and prodromal Alzheimer's disease // Neuroimage. 2011. Vol. 58. P. 469-480.

Dennis E.L., *Thompson P.M.* Functional brain connectivity using fMRI in aging and Alzheimer's disease // Neuropsychol. Rev. 2014. Vol. 24. P. 49-62.

Drzezga A. Amyloid-plaque imaging in early and differential diagnosis of dementia // Ann. Nucl. Med. 2010. Vol. 24. P. 55-66.

Drzezga A., *Barthel H., Minoshima S., Sabri O.* Potential clinical applications of PET/MR imaging in neurodegenerative diseases // J. Nucl. Med. 2014. Vol. 55. Suppl. 2. P. 47S-55S.

Dudley E., *Hässler F., Thome J.* Profiling for novel proteomics biomarkers in neurodevelopmental disorders // Expert Rev. Proteomics. 2011. Vol. 8. P. 127-136.

Escott-Price V., *Bellenguez C., Wang L. et al.* Gene-wide analysis detects two new susceptibility genes for Alzheimer's disease // PLoS One. 2014. Vol. 9. P. e94661.

Ferreira D., *Perestelo-Pérez L., Westman E. et al.* Meta-review of CSF core biomarkers in Alzheimer's disease: The state-of-the-art after the new revised diagnostic criteria // Front. Aging Neurosci. 2014. Vol. 6. P. 47.

Fisk L., Nalivaeva N.N., Boyle J.P. et al. Effects of hypoxia and oxidative stress on expression of neprilysin in human neuroblastoma cells and rat cortical neurones and astrocytes // Neurochem. Res. 2007. Vol. 32. P. 1741-1748.

François M., *Leifert W., Hecker J. et al.* Altered cytological parameters in buccal cells from individuals with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease // Cytometry A. 2014a. Feb 25. doi: 10.1002/cyto.a.22453. [Epub ahead of print].

François M., *Leifert W., Martins R. et al.* Biomarkers of Alzheimer's disease risk in peripheral tissues; focus on buccal cells // Curr. Alzheimer Res. 2014b. Jun 17. [Epub ahead of print].

Frankfort S.V., Tulner L.R., van Campen J.P. et al. Amyloid β protein and tau in cerebrospinal fluid and plasma as biomarkers for dementia: a review of recent literature // Curr. Clin. Pharmacol. 2008. Vol. 3. P. 123-131.

Haroutunian V., Hoffman L.B., Beeri M.S. Is there a neuropathology difference between mild cognitive impairment and dementia? // Dialogues Clin. Neurosci. 2009. Vol. 11. P. 171-179.

Huang J.Y., *Hafez D.M., James B.D. et al.* Altered NEP2 expression and activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease // J. Alzheimers Dis. 2012. Vol. 28. P. 433-441.

Jack C.R. Jr., *Wiste H.J., Vemuri P. et al.* Brain β-amyloid measures and magnetic resonance imaging atrophy both predict time-to-progression from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease // Brain. 2010. Vol. 133. P. 3336-3348.

Kiddle S.J., *Sattlecker M., Proitsi P. et al.* Candidate blood proteome markers of Alzheimer's disease onset and progression: a systematic review and replication study // J. Alzheimers Dis. 2014. Vol. 38. P. 515-531.

Lambert J.C., *Ibrahim-Verbaas C.A., Harold D. et al.* Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease // Nat. Genet. 2013. Vol. 45. P. 1452-1458.

Lista S., *Faltraco F., Prvulovic D., Hampel H.* Blood and plasma-based proteomic biomarker research in Alzheimer's disease // Prog. Neurobiol. 2013. Vol. 101-102. P. 1-17.

Liu Y., *Studzinski C., Beckett T. et al.* Circulating neprilysin clears brain amyloid // Mol. Cell Neurosci. 2010. Vol. 45. P. 101-107.

Lukiw W.J., *Andreeva T.V., Grigorenko A.P., Rogaev E.I.* Studying micro RNA function and dysfunction in Alzheimer's disease // Front. Genet. 2013. Vol. 3. P. 327.

Maccioni R.B., *Lavados M., Maccioni C.B., Mendoza-Naranjo A.* Biological markers of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment // Curr. Alzheimer Res. 2004. Vol. 1. P. 307-314.

Maddalena A., Papassotiropoulos A., Müller-Tillmanns B. et al. Biochemical diagnosis of Alzheimer disease by measuring the cerebrospinal fluid ratio of phosphorylated tau protein to beta-amyloid peptide42 // Arch. Neurol. 2003. Vol. 60. P. 1202-1206.

Manczak M., *Park B.S., Jung Y., Reddy P.H.* Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease: implications for early mitochondrial dysfunction and oxidative damage // Neuromolecular. Med. 2004. Vol. 5. P. 147-162.

Marksteiner J., *Pirchl M. Ullrich C. et al.* Analysis of cerebrospinal fluid of Alzheimer patients. Biomarkers and toxic properties // Pharmacology. 2008. Vol. 82. P. 214-220.

McKhann G.M., *Knopman D.S., Chertkow H. et al.* The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease // Alzheimers Dement. 2011. Vol. 7. P. 263-269.

Miyashita A., Koike A., Jun G. et al. SORL1 is genetically associated with late-onset Alzheimer's disease in Japanese, Koreans and Caucasians // PLoS One. 2013. Vol. 8. P. e58618.

Nalivaeva N.N., *Beckett C., Belyaev N.D., Turner A.J.* Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in Alzheimer's disease? // J. Neurochem. 2012a. Vol. 120. Suppl. 1. P. 167-185.

Nalivaeva N.N., *Belyaev N.D., Zhuravin I.A., Turner A.J.* The Alzheimer's amyloid-degrading peptidase, neprilysin: can we control it? // Int. J. Alzheimers Dis. 2012b. Vol. 2012. Art. JD. P. 383796.

Noel-Storr A.H., *Flicker L., Ritchie C.W. et al.* Systematic review of the body of evidence for the use of biomarkers in the diagnosis of dementia // Alzheimers Dement. 2013. Vol. 9. P. e96-e105.

O'Bryant S.E., Xiao G., Barber R. et al. A serum protein-based algorithm for the detection of Alzheimer disease // Arch. Neurol. 2010. Vol. 67. P. 1077-1081.

Petersen R.C. Mild cognitive impairment. Ageing to Alzheimer's disease. Oxford University Press Inc., 2003.

Petersen R.C., Stevens J.C., Ganguli M. et al. Practice parameter: early detection of dementia: mild cognitive impairment (an evidence-based review). Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology // Neurology. 2001. Vol. 56. P. 1133-1142.

Posner H.B., Cano S., Carrillo M.C. et al. Establishing the psychometric underpinning of cognition measures for clinical trials of Alzheimer's disease and its precursors: a new approach // Alzheimers Dement. 2013. Vol. 9. Suppl. 1. P. S56-60.

Prokšelj T., Jerin A., Muck-Seler D., Kogoj A. Decreased platelet serotonin concentration in Alzheimer's disease with involuntary emotional expression disorder // Neurosci. Lett. 2014. Vol. 578C. P. 71-74.

Rissman R.A., *Trojanowski J.Q., Shaw L.M., Aisen P.S.* Longitudinal plasma amyloid β as a biomarker of Alzheimer's disease // J. Neural. Transm. 2012. Vol. 119. P. 843-850.

Ritchie C., *Smailagic N., Noel-Storr A. et al.* Plasma and cerebrospinal fluid amyloid β for the diagnosis of Alzheimer's disease dementia and other dementias in people with mild cognitive impairment (MCI) // Cochrane Database Syst. Rev. 2014. Vol. 6. P. CD008782.

Sagare A.P., *Bell R.D., Zlokovic B.V.* Neurovascular dysfunction and faulty amyloid β-peptide clearance in Alzheimer disease // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2012. Vol. 2. P. a011452.

Sattlecker M., *Kiddle S.J., Newhouse S. et al.* Alzheimer's disease biomarker discovery using SOMAscan multiplexed protein technology // Alzheimers Dement. 2014. Apr 24. pii: S1552-5260(14)00031-4. doi: 10.1016/j.jalz.2013.09.016. [Epub ahead of print].

Schifilliti D., Santamaria L.B., Rosa G. et al. Cholinergic central system, Alzheimer's disease, and anesthetics liaison: a vicious circle? // J. Alzheimers Dis. 2010. Vol. 22. Suppl. 3. P. 35-41.

Shad K.F., Aghazadeh Y., Ahmad S., Kress B. Peripheral markers of Alzheimer's disease: surveillance of white blood cells // Synapse. 2013. Vol. 67. P. 541-543.

Sheinerman K.S., *Tsivinsky V.G., Abdullah L. et al.* Plasma microRNA biomarkers for detection of mild cognitive impairment: biomarker validation study // Aging (Albany NY). 2013. Vol. 5. P. 925-938.

Shi H., Belbin O., Medway C. et al. Genetic variants influencing human aging from late-onset Alzheimer's disease (LOAD) genome-wide association studies (GWAS) // Neurobiol. Aging. 2012. Vol. 33. P. 1849. e5-18.

Slaets S., *Le Bastard N., Theuns J. et al.* Amyloid pathology influences aβ1-42 cerebrospinal fluid levels in dementia with Lewy bodies // J. Alzheimers Dis. 2013. Vol. 35. P. 137-146.

Spigset O., *Wilhelmsson C., Mjörndal T., Eriksson S.* Serotonin 5-HT2A receptor binding in platelets from patients with Alzheimer's disease or vascular dementia // Int. Psychogeriatr. 2000. Vol. 12. P. 537-545.

Talib L.L., *Joaquim H.P., Forlenza O.V.* Platelet biomarkers in Alzheimer's disease // World J. Psychiatry. 2012. Vol. 2. P. 95-101.

Tang K., *Hynan L.S., Baskin F., Rosenberg R.N.* Platelet amyloid precursor protein processing: a bio-marker for Alzheimer's disease // J. Neurol. Sci. 2006. Vol. 240. P. 53-58.

Tikkanen I., *Salmela K., Hohenthal U. et al.* Increased serum neutral endopeptidase activity in acute renal allograft rejection // Am. J. Nephrol. 1996. Vol. 16. P. 273-279.

Veitinger M., *Varga B., Guterres S.B., Zellner M.* Platelets, a reliable source for peripheral Alzheimer's disease biomarkers? // Acta Neuropathol. Commun. 2014. Vol. 2. P. 65.

Velayudhan L., *Ryu S.H., Raczek M. et al.* Review of brief cognitive tests for patients with suspected ъmanagement of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline // Eur. J. Neurol. 2007. Vol. 14. P. e1-26.

Wang S., *Wang R., Chen L. et al.* Expression and functional profiling of neprilysin, insulin-degrading enzyme, and endothelin-converting enzyme in prospectively studied elderly and Alzheimer's brain // J. Neurochem. 2010. Vol. 115. P. 47-57.

Yang M., *Yi X., Wang J., Zhou F.* Electroanalytical and surface plasmon resonance sensors for detection of breast cancer and Alzheimer's disease biomarkers in cells and body fluids // Analyst. 2014. Vol. 139. P. 1814-1825.

Youn Y.C., *Park K.W., Han S.H., Kim S.* Urine neural thread protein measurements in Alzheimer disease // J. Am. Med. Dir. Assoc. 2011. Vol. 12. P. 372-376.

Молекулярные аспекты патогенеза и современные подходы к фармакологической коррекции болезни Альцгеймера

М.С. Кухарский, Р.К. Овчинников, А.А. Устюгов, С.О. Бачурин

Содержание

1. Введение
2. Роль β-амилоида в патогенезе БА
3. Роль тау-белка в развитии БА
4. Основные гипотезы патогенеза БА
5. Взаимосвязь между Аβ и тау
6. Синаптическая дисфункция при БА
7. Гипотеза нейроиммуномодуляции
8. Новые подходы к лечению БА

1. Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенным возрастным нейродегенеративным расстройством и наиболее частой причиной деменции среди пожилых людей (Завалишин и др., 2001; Brookmeyer et al., 1998; Thies et al., 2013). Большинство форм БА являются спорадическими. Появление симптомов, как правило, начинается после 65–70 лет – это так называемые формы с поздним началом (Late Onset Alzheimer's Disease, LOAD). В небольшом числе случаев, однако, выявлен Менделевский тип наследования, и такие варианты выделяются в группу семейных форм БА (Familial Alzheimer's Disease, FAD). Установлено, что мутации в трех различных генах: белка предшественника амилоида, пресенелинов-1 и -2 (*APP*, *PSEN1*, *PSEN2*, соответственно), приводят к развитию наследственных форм заболевания, которые характеризуются ранним началом появления клинических симптомов (до 65 лет) (Chartier-Harlin et al., 1991; Goate, 2006; Goate et al., 1991; Sherrington et al., 1995). Нейропатологически и семейные, и спорадические формы БА удивительно похожи и характеризуются наличием двух типов белковых агрегатов в нервных тканях больных: амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков.

Амилоидные бляшки – компактные сферические внеклеточные отложения, состоящие из небольшого белка (~4 кДа), называемого β-амилоидным пептидом (Аβ) (Glenner et al., 1984). Эти внеклеточные включения обычно обнаруживаются в от-

---

Сокращения: АХ – ацетилхолин; БА – болезнь Альцгеймера; БуХЭ – бутирилхолинэстераза; ИХЭ – ингибиторы холинэстераз; ФТД – фронтотемпоральная дегенерация; APLP – амилоид-подобный белок; APP – белок предшественник амилоида; Аβ – β-амилоидный пептид; IL – интерлейкин; IRS-1 – субстрат инсулинового рецептора 1; LTP – долговременная потенциация; nAChR – никотиновые ацетилхолиновые рецепторы; NFTs – нейрофибриллярные клубки; PSEN – пресенелин; RAGE – рецептор высокогликозилированных конечных продуктов.

делах лимбической системы мозга, таких как гиппокамп и миндалевидное тело, а также в корковых и подкорковых отделах. Большинство бляшек в мозге пациентов с БА являются структурами диффузного типа, они окружены всего лишь несколькими дистрофическими дендритами и аксонами. Гораздо меньше при патогистологическом анализе аутопсийного материала, полученного от больных, выявляется амилоидных отложений (нейритных бляшек), которые плотно окружены дистрофическими нейритами.

Нейрофибриллярные клубки – это внутриклеточные агрегаты, основным компонентом которых являются агрегированные формы гиперфосфорилированного белка тау (Goedert et al., 1988; Grundke-Iqbal et al., 1986a). Эти нитевидные включения встречаются как в аксонах, так и в телах нейронов. Наличие белковых агрегатов в мозге пациентов с БА сочетается с дополнительными патологическими изменениями, которые включают потерю синапсов, атрофию мозгового вещества, выборочное истощение нейромедиаторных систем (например ацетилхолиновой) и в ряде случаев присутствие патогистологических структур другого типа, например телец Леви (Giasson et al., 2003; Hansen et al., 1993; Selkoe, 1991).

БА была впервые описана Алоисом Альцгеймером в 1907 году. Изучение патогенеза этого заболевания привело к появлению большого количества гипотез, и, несмотря на значительный прогресс в нейробиологии и медицине за последние несколько десятилетий, целостную картину развития заболевания окончательно установить не удалось. Остается неясной и его этиология. В то же время, удалось выявить важнейшие составляющие патогенеза БА, в том числе и на молекулярном уровне (Maccioni et al., 2009). Согласно современным представлениям, БА является протеинопатией, развивающейся вследствие нарушения метаболизма белка – предшественника амилоида и тау-белка (Шелковникова и др., 2012; Nussbaum et al., 2013; Walker et al., 2013). Ключевым патологическим событием является потеря белком его нормальной конформации, что приводит к накоплению олигомеров, состоящих из нескольких пептидов, которые в свою очередь объединяются в промежуточные формы агрегатов и, наконец, образуют нерастворимые агрегаты. Растворимые олигомеры и промежуточные продукты агрегации являются наиболее токсичными для нервных клеток, тогда как конечные продукты агрегации относительно инертны. Это характерно как для β-амилоида так и для тау-белка (Khlistunova et al., 2006; Walsh et al., 2007). Нарушения когнитивных функций у человека и модельных животных коррелируют именно с количеством олигомеров в мозге, а не с общим содержанием патогенного белка (Lee et al., 2005; Lue et al., 1999; Oddo et al., 2006; Santacruz et al., 2005). Исходя из этого можно предположить, что образование нерастворимых агрегатов является своего рода защитным механизмом, направленным на выведение токсичных продуктов из функционального пространства клетки.

2. Роль β-амилоида в патогенезе БА

β-амилоидный пептид, являющийся основным белковым компонентом диффузных и нейритных бляшек, образуется путем протеолиза из белка – предшественника амилоида (APP, рис. 1).

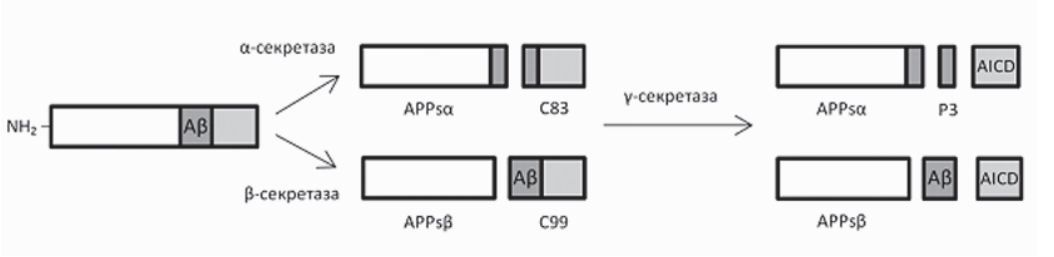


Рис. 1. Различные пути протеолиза белка APP с помощью α-, β- и γ-секретазы
Серый прямоугольник – участок белковой молекулы, соответствующий Aβ-пептиду, темно-серый прямоугольник – участок белковой молекулы, соответствующий внутриклеточному домену APP (AICD). APPsα, APPSβ, C83, C99, P3 – фрагменты белка APP

APP относится к трансмембранным белкам 1 типа: С-конец Aβ-пептида погружен в клеточную мембрану. Процессинг APP может протекать двумя различными путями. Неамилоидогенное расщепление происходит в нейронах при участии белков семейства α-секретаз. Основным ферментом с α-секретазной активностью является белок ADAM10 (Jorissen et al., 2010; Kuhn et al., 2010). Мембрано-ассоциированная металлопротеаза α-секретаза расщепляет APP внутри Aβ-домена между 16 и 17 аминокислотными остатками (Esch et al., 1990), тем самым предотвращая образование Aβ. Вместо этого образуется растворимая N-часть APP (APPsα) и С-концевой фрагмент, состоящий из 83 аминокислотных остатков (C83). C83-фрагмент может подвергаться дальнейшему расщеплению γ-секретазой с высвобождением p3-пептида, который считается неамилоидогенным, хотя он и откладывается в диффузных бляшках. При амилоидогенном способе расщепления APP проходят две последовательные эндопротеолитические стадии, осуществляемые ферментами β- и γ-секретазой. β-секретаза (BACE1) расщепляет APP в области N-конца Aβ-пептида. В результате образуется более короткий растворимый N-конец (sAPPβ) и амилоидогенный С-концевой фрагмент (C99). Дальнейшее расщепление фрагмента C99 γ-секретазой высвобождает Aβ и С-концевой участок из 50 аминокислот, который известен как внутриклеточный домен белка APP (AICD) (LaFerla, Oddo, 2005). Под действием γ-секретазы могут образовываться амилоидные пептиды различной длины. Чаще всего образуется пептид длиной 40 аминокислот (Aβ40), в меньшем количестве – 42-аминокислотный вариант (Aβ42). Секретазы α и β функционируют независимо, и ингибирование одного из путей протеолиза не оказывает влияния на другой (Sinha et al., 1999). Стоит отметить, что образование Aβ представляет собой нормальный физиологический процесс, причем амилоидогенный путь расщепления белка APP более выражен в культурах клеток нейронального происхождения (Haass et al., 1992; Seubert et al., 1993).

Функция цельного белка APP до конца еще не ясна. У генетически модифицированных мышей, из генома которых удален ген *APP*, выявлены лишь незначительные неврологические нарушения (Muller et al., 1994; Zheng et al., 1995). Отсутствие явного фенотипа, возможно, объясняется компенсаторным эффектом, опосредо-

ванным двумя другими членами семейства генов APP – предшественниками амилоид-подобных белков 1 и 2 (*APLP1*, *APLP2*) (Wasco et al., 1992). Эта точка зрения подтверждается данными, показывающими, что совместное удаление генов *APP* и *APLP2,* либо двух *APLP*, либо всех трех членов семейства приводит к ранней постнатальной смерти (Heber et al., 2000). Экспериментальные данные показывают, что APP играет важную роль в процессах клеточного роста и пролиферации, а также может служить трофическим фактором и влияет на рост нейритов и синаптогенез (Dawkins et al., 2014).

3. Роль тау-белка в развитии БА

Нейрофибриллярные клубки – это нитевидные включения, которые накапливаются в значительном числе нейронов мозга пациентов с БА. Данные патологические включения также встречаются и при других нейродегенеративных расстройствах, включая фронтотемпоральную деменцию с паркинсонизмом, сцепленную с 17-й хромосомой (Frontotemporal dementia with parkinsonism-17, FTDP-17), болезнь Пика, прогрессивный супрануклеарный паралич (Progressive Supranuclear Palsy, PSP) и кортикобазальную дегенерацию (Corticobasal degeneration, CBD). Основным компонентом нейрофибриллярных клубков является белок тау, ассоциированный с микротрубочками (Goedert et al., 1988; Grundke-Iqbal et al., 1986a). В нормальном состоянии тау представляет собой растворимый белок, который способствует сборке и стабилизации микротрубочек. При гиперфосфорилировании тау-белка он переходит в патологическое состояние с последующим формированием нитевидных структур (рис. 2) (Goedert et al., 1992; Grundke-Iqbal et al., 1986b).

Было показано, что гиперфосфорилированный тау проявляет сниженное сродство к микротрубочкам (Biernat et al., 1993; Bramblett et al., 1993). Белок тау кодируется в геноме мыши и человека единственным геном (*MAPT*), расположенным на 17-й хромосоме, а в результате альтернативного сплайсинга в мозге взрослого человека образуются шесть основных изоформ белка (Goedert et al., 1989). Ген *MAPT* содержит 15 экзонов; 2-й, 3-й и 10-й могут подвергаться альтернативному сплай-

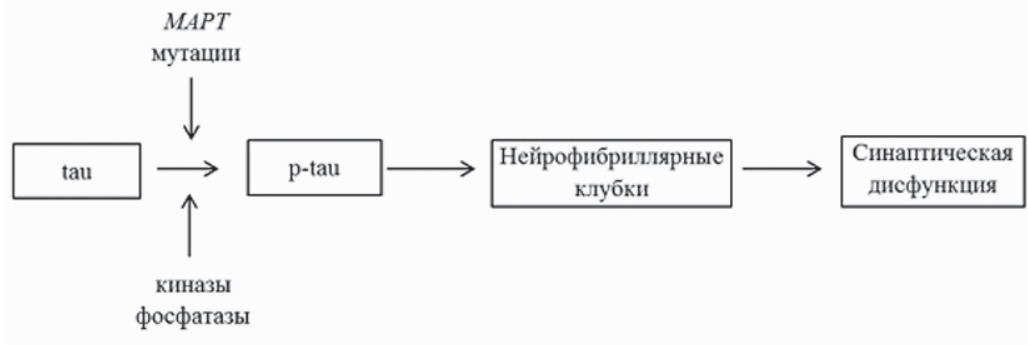


Рис. 2. Роль тау-белка в патогенезе БА в рамках тау-гипотезы

сингу. Четыре несовершенных тандемных повтора кодируются экзонами 9–12, поэтому альтернативный сплайсинг 10-го экзона дает изоформы, содержащие по три или по четыре домена с повторами, обозначаемые как 3R- и 4R-формы тау, в зависимости от того, отсутствует или присутствует 10-й экзон, соответственно. Альтернативный сплайсинг экзонов 2 и 3 дает варианты, содержащие ноль (0N), одну (1N) или две (2N) вставки на N-конце, так что формируется шесть изоформ тау: 3R0N, 3R1N, 3R2N, 4R0N, 4R1N и 4R2N. В мозге взрослого человека соотношение 3R к 4R тау составляет 1:1, в то время как в мозге взрослых мышей тау представлен единственной изоформой 4R (Gotz et al., 1995; Janke et al., 1999). Таупатии могут быть дополнительно классифицированы в зависимости от того, состоят ли клубки из 3R- или 4R-изоформы. Например, при БА оба варианта (3R и 4R) тау накапливаются в нейрофибриллярных клубках, при других заболеваниях отмечаются только 3R- (например болезнь Пика) или 4R-формы тау (например при прогрессирующем супрануклеарном параличе и кортикобазальной дегенерации) (Delacourte et al., 1998; Sergeant et al., 1999). При БА тау-патология наблюдается только в нейронах, однако при других тау-патиях, таких как 4R тау-патии, характерные для прогрессирующего супрануклеарного паралича и кортикобазальной дегенерации, тау-включения наблюдаются также и в глии (Lee et al., 2001). Ген, кодирующий тау, генетически не ассоциирован с БА, а выявленные в нем мутации ассоциированы с некоторыми формами фронтотемпоральной дегенерации (ФТД) (Spillantini et al., 1998). В результате идентификации патогенных мутаций в гене, кодирующем тау (*MAPT*), было показано, что дисфункции тау самой по себе достаточно для того, чтобы вызвать нейродегенерацию (Hutton et al., 1998). Однако отсутствие генетической связи с БА указывает на то, что тау-патология в каскаде процессов нейродегенерации находится после развития амилоидоза мозга. Это не означает, что тау-патология не имеет значения в патогенезе БА, более того, нейродегенерация, вызванная дисфункцией тау, может играть центральную роль при БА. Возможно, что тау-патология может быть вызвана различными механизмами – как зависящими от Аβ, так и не зависящими от нарушения процессинга APP.

4. Основные гипотезы патогенеза БА

В течение последних двух десятилетий в теории патогенеза БА центральной являлась амилоидная гипотеза, основанная на представлениях о том, что патологические события, вызванные каскадной агрегацией β-амилоида (Аβ), – это главный инициатор нейродегенеративного процесса.

Данная гипотеза (рис. 3) предполагает, что накопление амилоидных пептидов в мозге является первоначальным фактором в патогенезе, а далее в процессе развития заболевания продолжается как результат дисбаланса между образованием и выведением Аβ (Hardy, Selkoe, 2002).

Убедительные доказательства этой гипотезы вытекают из молекулярно-генетических исследований трех генов (*APP, PS1, PS2*), ассоциированных с наследственными формами БА, так как все они регулируют в той или иной степени метаболизм

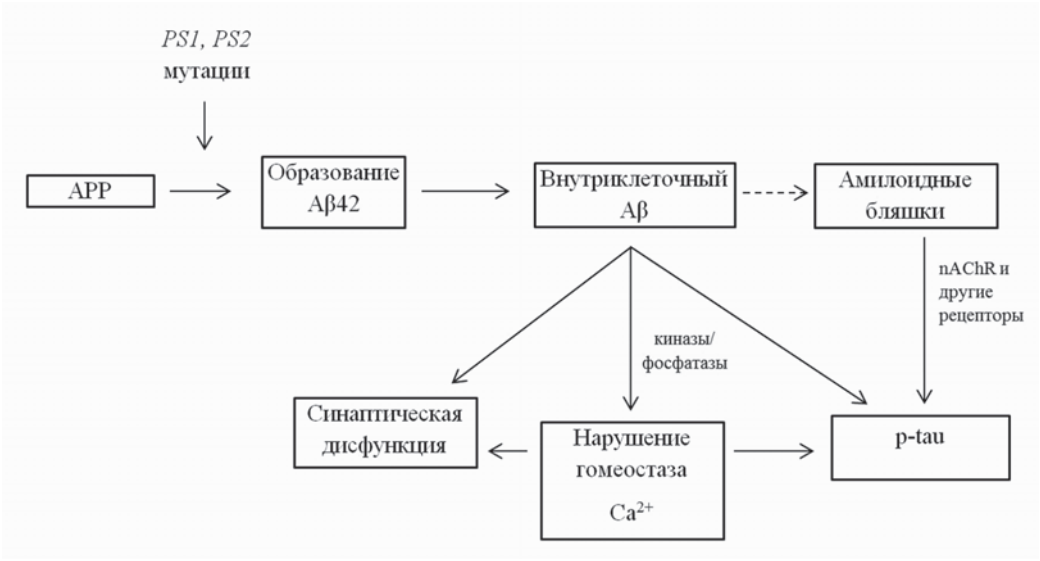


Рис. 3. Роль Aβ в патогенезе БА в рамках амилоидной гипотезы, из статьи (LaFerla, Oddo, 2005), с изменениями

Aβ, повышая его склонность к агрегации (Scheuner et al., 1996). Кроме того, наличие ε4-алелля гена аполипопротеина Е, который является основным фактором риска для болезни с поздним началом, влияет на скорость агрегации Aβ (Bales et al., 1999). Тем не менее, клинические испытания препаратов, изменяющих метаболизм и катаболизм амилоидных пептидов, оказались неубедительными. Фактически амилоидная гипотеза привела к малопродуктивным подходам в поиске терапии БА (Hardy, 2009). Это относится к вакцинам против Aβ, антителам против β-амилоида, ингибиторам γ-секретазы и препаратам, непосредственно блокирующим агрегацию Aβ (http://www.jnj.com; Extance, 2010; Rinne et al., 2010; Vellas et al., 2013).

Относительно форм заболевания с ранней манифестацией существует представление об объединении генетических факторов и/или факторов окружающей среды, ведущих к болезни, и повышении их роли по мере старения (Glatz et al., 2006; Maccioni et al., 2010). В процессе развития заболевания запускается каскадный механизм патологических событий, среди которых выделяют накопление олигомеров Aβ, перенасыщение железом, образование активных форм кислорода и другие. Это, в свою очередь, отражается на функционировании микроглии и вызывает изменения в сигналах, передаваемых к нейронам (Maccioni et al., 2009; Fernandez et al., 2008; Morales et al., 2010). Развивается нейрональная дисфункция, нарушения нейромедиаторных систем, что приводит к гибели клеток и появлению клинических признаков деменции.

Долгое время считалось, что нарушение метаболизма APP в центральной нервной системе приводит к образованию сенильных бляшек (Hardy, 2009; Hardy, Selkoe, 2002). Основная проблема данной гипотезы связана с тем, что у значительного числа здоровых людей обнаруживаются сенильные бляшки при отсутствии признаков когнитивной дисфункции (Aizenstein et al., 2008; Klunk, Perani, 2013).

Кроме того, клинические испытания различных анти-амилоидных препаратов, несмотря на установленный эффект на преклинической стадии, показали отсутствие когнитивных и/или функциональных улучшений у пациентов на развитой стадии БА (Aizenstein et al., 2008; Panza et al., 2011). В данном контексте амилоидно-каскадная гипотеза не смогла дать интегративного объяснения патогенеза БА. При этом постоянно растет интерес к гипотезе тау-патии (см. рис. 2), согласно которой нарушение фосфорилирования тау-белка, вероятно, приводит к образованию нейрофибриллярных клубков и последующей гибели нейронов, а нарушения функционирования тау рассматривается как одна из основных причин когнитивных нарушений при БА (Navarrete et al., 2011). Существуют также предположения о возможной связи между APP и тау (Alvarez et al., 2001; Czapski et al., 2011; Otth et al., 2003). Исследования на мышах, моделирующих церебральный амилоидоз и скрещенных с мутантами по гену белка тау, инъекции Аβ в мозг мышей линии тау, а также эксперименты с культурами нейронов подтверждают, что Аβ-агрегаты могут активировать прогрессию тау-патии и стимулировать формирование нейрофибриллярных клубков в нейронах модельных животных (Hernandez et al., 2009; Kocherhans et al., 2010; Otth et al., 2003).

5. Взаимосвязь между Аβ и тау

Амилоидно-каскадная гипотеза постулирует, что формирование патогенных Аβ пептидов является триггером для всех случаев БА и что агрегация тау и другие дегенеративные изменения являются вторичными по отношению к амилоидной патологии (Hardy, Selkoe, 2002). Следуя данной логике, трансгенез конструктов, кодирующих APP или пресенилины (PS) с патогенными мутациями, должен приводить к развитию широкого спектра нейропатологических изменений, связанных с БА, у модельных генетически модифицированных животных. Хотя у мышей, несущих мутантные формы *APP* или одновременно мутантные *APP* и *PS1*, образуется большое количество амилоидных отложений, оказалось, что этого недостаточно, чтобы инициировать остальные ключевые составляющие молекулярного патогенеза БА (Borchelt et al., 1997; Games et al., 1995; Holcomb et al., 1998; Hsiao et al., 1996). В частности, у таких трансгенных мышей не наблюдается существенной нейрофибриллярной патологии. Противники амилоидно-каскадной гипотезы указывают на эти факты как на критический недостаток гипотезы, хотя объективно могут существовать причины проявления данного эффекта. Например, продолжительность жизни мышей может быть слишком короткой для того, чтобы амилоидная патология вызвала появление нейрофибриллярных клубков.

Нейрофибриллярная патология может быть смоделирована в мышах путем введения мутаций, ассоциированных с FTDP-17, в ген *MAPT*. При этом развивается выраженная тау-патия с последующей нейродегенерацией (Allen et al., 2002; Lewis et al., 2000). Дж. Льюис с сотрудниками провели скрещивание мышей, мутантных по *APP* и *MAPT* (Lewis et al., 2001). Они обнаружили, что у животных, несущих обе трансгенные кассеты, развивается более выраженная нейрофибриллярная

патология в сравнении с мышами, мутантными только по гену *MAPT*. Дж. Готс с сотрудниками показали, что интракраниальное введение раствора Аβ пептидов мышам, мутантным по тау, приводит к образованию клубков в миндалевидном теле (Gotz et al., 2001). Имеются и другие данные о том, что Аβ может вызывать или усиливать тау-патию (Oddo et al., 2003). Например, при сравнении мышей линии 3xTg-AD, несущих человеческие мутантные гены *APP* (Шведская мутация KM670/671NL), *MAPT* (hP301L) и *PSEN1* (M146V), и мышей – двойных трансгенов по мутантному *PSEN1* и мутантному *MAPT* (тау), полученных на том же генетическом фоне, что и 3xTg-AD, было выявлено, что у последних не развивается какой-либо Аβ-патологии. При этом уровень экспрессии гена, кодирующего тау, шестикратно превышает уровень эндогенного мышиного гена у 3xTg-AD мышей. Однако у таких мышей, мутантных по PS1/tau, развивается менее тяжелая патология с более поздним началом по сравнению с 3xTg-AD-мышами, что указывает на способность Аβ модулировать начало и прогрессирование тау-патологии.

Подтверждением взаимного влияния Аβ и тау являются данные С. Оддо с коллегами о том, что выведение Аβ с помощью иммунотерапии приводит к блокированию ранней тау-патологии (Oddo et al., 2004). Исчезновение обоих нарушений происходит иерархически: после одной инъекции в гиппокамп антител против Аβ, очистка от Аβ предшествовала исчезновению признаков ранней тау-патологии. Более того, как только антитела самовыводились или деградировали, сначала восстанавливалась Аβ-патология, а затем тау-патология. Эти результаты служат убедительным доказательством амилоидно-каскадной гипотезы. Дж. Оддо с сотрудниками также показали, что гиперфосфорилированные и окрашивающиеся серебром тау включения проявляют устойчивость к выведению с помощью иммунотерапии, направленной против Аβ. Эти данные согласуются с существованием двух различных этапов тау-патологии: ранней стадии, при которой тау накапливается в соматодендритном компартменте и не окрашивается методом импрегнации серебром по Джейлису, при этом тау может быть выведен с использованием противо-Аβ-подхода, и поздней стадии, при которой тау окрашивается по Джейлису, и не может быть выведен с использованием антител против Аβ.

Достигнут определенный успех в понимании механизмов, посредством которых амилоидные пептиды способны стимулировать гиперфосфорилирование тау. Показано, что Аβ взаимодействует с никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAChR), при этом облегчается переход амилоидного пептида из α- в β-складчатую структуру (Maatuk, Samson, 2013; Wang et al., 2003). Одновременно с этим наблюдается активация митоген-активируемых киназ JNK-1 и ERK. Блокирование взаимодействия Аβ42 с nAChR, а также ингибирование указанных киназ приводит к уменьшению гиперфосфорилирования белка тау (Wang et al., 2003). В качестве еще одного механизма действия Аβ на тау-патологию, рассматривается инсулин-зависимый сигнальный путь. Активация JNK-1 ведет к деградации адаптера субстрата инсулинового рецептора 1 (IRS-1), а также к нарушению инсулин-зависимого фосфорилирования киназ Akt и GSK3β (Ma et al., 2009; Tokutake et al., 2012). Все эти события сопряжены с повышением уровня гиперфосфорилированного тау, а при их коррекции наблюдается ослабление тау-патологии.

6. Синаптическая дисфункция при БА

Важнейшим патологическим событием при БА является нарушение синаптической передачи (Selkoe, 2002). У пациентов со средней тяжестью заболевания наблюдается снижение количества пресинаптического белка синаптофизина на 25% (Masliah et al., 2001). По мере развития заболевания наблюдается преимущественная потеря синапсов в сравнении с потерей нейронов, и этот процесс коррелирует с прогрессией деменции (DeKosky, Sheff, 1990; Terry et al., 1991).

Воспроизведение амилоидоза и нейрофибриллярной патологии в модельных организмах позволяет установить взаимосвязь этих белковых структур с важнейшими неврологическими процессами в мозге, такими как обучение и память, синаптическая пластичность и нейровоспаление. Известно, что у 3xTg-AD-мышей нарушена память, пространственное и условное обучение, а тяжесть этих нарушений коррелирует с возрастом. В частности, начало когнитивных нарушений регистрируется до развития выраженной симптоматики, связанной с амилоидными бляшками или нейрофибриллярными клубками, и обусловлено накоплением внутри нейронов Aβ (Billings et al., 2005). Удаление таких включений иммунотерапией предотвращает развитие когнитивных нарушений, однако после отмены терапии эти нарушения восстанавливаются. Свидетельства того, что Aβ, накапливающийся внутри нейронов, провоцирует развитие когнитивных нарушений, согласуются с данными о том, что он вызывает синаптическую дисфункцию. Как и в случае с изменениями в когнитивной сфере, нарушения в синаптической пластичности проявляются до накопления выявляемых при микроскопическом анализе включений и лучше коррелируют с накоплением Aβ внутри клеток. Однако остается неясным вопрос, происходит ли накопление амилоидных пептидов в пре- или постсинаптических клетках. В целом эти результаты показывают, что синаптическая дисфункция и когнитивные нарушения являются ранними событиями в патогенезе БА. Они также согласуются с данными, полученными на другой трансгенной модели (PDGF-APP_{Ind}), для которой было показано, что синаптический дефицит предшествует накоплению амилоидных бляшек (Hsia et al., 1999).

Для того чтобы идентифицировать молекулярные детерминанты, лежащие в основе нарушений синаптической пластичности, было проведено сравнение основной передачи, суммации импульсов и долговременной потенциации (LTP) между трансгенными мышами различных генотипов (NonTg, PS1KI, PS1KI/tau и 3xTg-AD) (Oddo et al., 2003). В результате было показано, что нарушения синаптической пластичности развиваются и прогрессируют с возрастом. В возрасте одного месяца все группы демонстрировали сравнимые электрофизиологические профили, что свидетельствует о том, что наличие трансгена само по себе не достаточно для изменения синаптической передачи и что мыши при рождении являются здоровыми. У сравнительно молодых 3xTg-AD-животных, в возрасте шести месяцев, развиваются уже глубокие нарушения LTP, в то время как у PS1KI/tau-мышей того же возраста изменений не наблюдалось, несмотря на сравнимый уровень экспрессии мутантного тау в обеих линиях. Более того, у PS1KI-мышей не отмечалось при этом нарушений LTP. Данное исследование показало, что накопление внутрикле-

точного Аβ в пирамидальных нейронах является исключительно важным событием для инициирования синаптических нарушений у 3xTg-AD-мышей.

Одной из причин гибели синапсов и нейронов при БА является дестабилизирующее влияние Аβ на митохондрии (Бачурин, 2001; Шевцова и др., 2001; Mungarro-Menchaca et al., 2002). Амилоидные пептиды способны ингибировать ключевые ферменты митохондрий, в особенности цитохром С оксидазу (Caspersen et al., 2005; Hauptmann et al., 2006; Reddy, Beal, 2008). Следствием нарушений в работе митохондрий является высвобождение свободных радикалов и оксидативный стресс, а также запуск апоптоза (Good et al., 1996; Smith et al., 1996).

Описанные исследования сыграли важную роль для развития данного направления, поскольку выявили патофизиологическую роль внутриклеточного Аβ в возникновении нейрональной и синаптической дисфункции. Непосредственная роль белка тау в развитии синаптической дисфункции до конца еще не ясна. Показано, что в норме в мозге человека тау локализуется в аксонах, а также в пре- и постсинаптических терминалях (Tai et al., 2012), в то время как у пациентов с БА тау находится в гиперфосфорилированном состоянии, агрегирует и обнаруживается также в телах нейронов. Накопление гиперфосфорилированной формы тау в синапсах ассоциировано с увеличением количества 26S-субъединицы протеасом и шаперона VCP, который доставляет субстраты к протеасомам. Предполагается, что ранняя тау-патология развивается не в результате потери нейронов, а из-за нарушения в работе синапсов, вызванного накоплением гиперфосфорилированного тау в дендритных шипиках, что приводит к ухудшению процессов перемещения и заякоривания глутаматных рецепторов (Hoover et al., 2010).

7. Гипотеза нейроиммуномодуляции

Представления, сложившиеся в рамках амилоидной и тау-гипотез, не могли объяснить весь фактический материал, накопленный в многочисленных исследованиях. Постепенно происходило формирование более широких представлений о патогенезе БА, в которых рассматривались все патологические составляющие заболевания, что, в свою очередь, позволило определить новые терапевтические мишени. При рассмотрении БА с позиции ее мультифакторной природы ряд исследователей придерживается мнения, что возникающая цепь сигналов о повреждении передается различным клеткам мозга (главным образом микроглии), которые, в свою очередь, запускают ответные реакции со стороны системы нейроиммуномодуляции. Предполагается, что такие патологические сигналы в конечном итоге могут приводить к самоагрегации тау-белка с образованием олигомеров и фибрилл (Maccioni et al., 2010).

Воспаление – это процесс, тесно связанный с развитием целого ряда нейродегенеративных расстройств, в том числе БА. Многие существующие гипотезы объясняют патогенез БА, но не дают ясности относительно ранних событий, которые инициировали метаболические и клеточные изменения, приведшие к нейродегенеративным процессам (Rojo et al., 2008). В течение последних пяти лет появились

дополнительные свидетельства в поддержку представлений о том, что нарушения в работе системы взаимодействия между глиальными клетками и нейронами играют важную роль в процессе нейрональной дегенерации. Нейроны и клетки глии совместно с кровеносными сосудами образуют интегрированную систему функционирования мозга. Изучение патологических изменений в сигнальных связях между нейронами и глией привело к появлению гипотезы нейроиммуномодуляции (рис. 4).

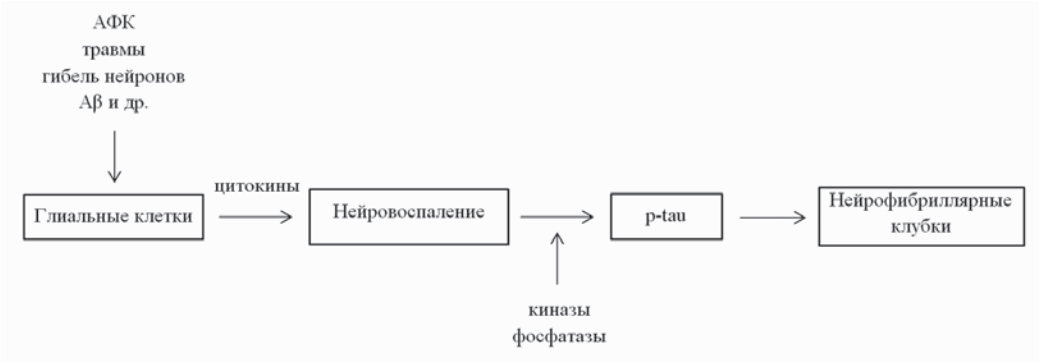


Рис. 4. Патогенез БА в рамках гипотезы нейроиммуномодуляции

Имеющиеся данные говорят о важной роли иммунной системы при старении мозга и развитии нейродегенеративных болезней, при этом взаимодействие между указанными системами определяет прогрессию патологического процесса (Lucin, Wyss-Coray, 2009). В данном контексте микроглия и резидентные макрофаги центральной нервной системы являются ключевым фактором в регулировании локальной окружающей среды клеток и определяют статус воспалительного процесса. Длительное активирование микроглии после острого повреждения и при хронических заболеваниях говорит в пользу того, что эти клетки имеют иммунную память о тканевом повреждении и дегенерации. Фенотип микроглии также изменяется при системных инфекциях или воспалении (Perry et al., 2010). Идея о том, что изменения в иммуномодуляции критичны для патогенеза БА, представляет собой наиболее интегративный взгляд на развитие патологии, а дальнейшие исследования позволят выявить роль воспалительного процесса при данном заболевании.

Исследования на культурах клеток микроглии и нейронов совместно с экспериментами на животных моделях, а также клинические данные подтверждают, что эндогенные повреждающие факторы, такие как Aβ-олигомеры, активные формы кислорода, перенасыщение железом, недостаток фолата, травмы головы, определенные виды липопротеинов низкой плотности и гомоцистеин, являются триггером для активации клеток микроглии. Провоспалительные цитокины играют двойственную роль и могут как усиливать нейродегенеративный процесс, так и оказывать нейропротекторное действие. Это равновесие смещается в сторону нейродегенерации под действием целого набора выявленных факторов риска, которые запускают врожденные системы передачи сигналов о повреждении, активируют

микроглию и способствуют высвобождению провоспалительных цитокинов (Fernandez et al., 2008; Maccioni et al., 2009).

Развитие патологического процесса при БА сопровождается накоплением повреждений паренхимы мозга, которые предшествуют манифестации клинических симптомов. Считается, что нарушения в функционировании ткани инициируют систему сигналов о повреждении и запускают нейровоспалительный процесс. Такие сигналы через Toll-подобные рецепторы, рецептор высокогликозилированных конечных продуктов (RAGE) или другие глиальные рецепторы активируют иммунную систему, что в свою очередь приводит к аномальному высвобождению цитокинов и запуску каскада нейродегенерации. Описанные события сопровождаются активацией NFkB с последующим высвобождением цитокинов, таких как TNF-α, IL-6, IL-1β. Сверхпродукция данных медиаторов может приводить к активации киназ GSK3β, cdk5, а также ингибированию фосфатаз, например PP1. В результате происходит накопление гиперфосфорилированной формы белка тау и его агрегация в нейротоксичные олигомерные формы. Агрегация тау-белка – это одно из конечных ключевых событий в патогенезе БА (Farias et al., 2011; Morales et al., 2010).

Данные, свидетельствующие о связи нейровоспалительных процессов и гиперфосфорилирования тау, были получены в исследованиях маркеров нейропатологии и на трансгенных мышиных моделях БА. Активированная микроглия обнаруживается post mortem в аутопсийном материале больных с различными тау-патиями, включая БА и ФТД (Gebicke-Haerter, 2001). У трансгенных мышей линий 3xTg и rTg4510, моделирующих важные аспекты БА, введение липополисахаридов, вызывающих системное воспаление, усиливает гиперфосфорилирование тау (Kitazawa et al., 2005; Lee et al., 2010a). У мышей, моделирующих тау-патологию, активация микроглии предшествует формированию нейрофибриллярных клубков. К тому же, иммуносупрессия с помощью FK506 у молодых мышей линии P301S ослабляет развитие тау-патологии и увеличивает среднею продолжительность жизни модельных животных (Yoshiyama et al., 2007). Таким образом, можно сделать заключение, что нейровоспалительная реакция связана с нарушениями в функционировании тау белка. В то же время, было показано, что введение липополисахарида не влияет на развитие церебрального амилоидоза у модельных мышей (Kitazawa et al., 2005), а по данным некоторых авторов, в используемых ими экспериментальных системах даже способствует снижению количества амилоидных отложений (DiCarlo et al., 2001; Herber et al., 2007; Herber et al., 2004; Quinn et al., 2003). На крысиной модели тау-патии, где причиной развития нейродегенеративного процесса служит укороченная форма тау-белка человека, показана индукция воспалительного ответа, проявляющегося в повышении экспрессии «молекул иммунитета» (CD11a,b, CD18, CD4, CD45, CD48), морфологической активации клеток микроглии и инфильтрации лейкоцитов (Zilka et al., 2009).

С другой стороны, медиаторы воспаления, такие как интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-6 (IL-6) и оксид азота, высвобождающиеся из астроцитов, могут усиливать фосфорилирование тау и формирование нейрофибриллярных клубков (NFTs) *in vitro* (Li Y. et al., 2003; Quintanilla R.A. et al., 2004; Saez T.E. et al., 2004). В ряде работ показано, что избыточное фосфорилирование тау, вызванное высвобожде-

нием интерлейкинов, вероятно, опосредовано через сигнальные пути p38-MAPK и CDK5/p35. Кроме того, активация микроглии и воздействие микроглиального провоспалительного цитокина TNFα стимулирует образование активных форм кислорода, что в свою очередь индуцирует накопление склонного к агрегации тау в нейритах (Gorlovoy et al., 2009).

Было обнаружено, что рецептор к фракталкину (CX3CR1), принимающий участие в коммуникации между клетками микроглии и нейронами, играет ключевую роль в развитии когнитивных нарушений при БА. У трансгенных мышей с мутантным геном белка тау человека и нокаутных по гену *Cx3cr1*, наблюдается усиление тау-патологии, которое коррелирует с повышенным уровнем активности p38-MAPK. Эксперименты *in vitro* показывают, что активация микроглии повышает уровень активной p38-MAPK и усиливает гиперфосфорилирование тау в нейронах, и эти эффекты могут быть заблокированы антагонистами рецептора к IL-1 и специфическими ингибиторами p38-MAPK. Эти данные указывают на то, что CX3CR1 и IL-1/p38-MAPK-пути могут служить новой терапевтической мишенью для разработки терапии тау-патий (Bhaskar et al., 2010). Интересным представляется тот факт, что недостаточность CX3CR1 способна ослаблять Aβ-патологию, препятствуя гибели нейронов кортикального слоя II в мозгу 3xTg-мышей (Fuhrmann et al., 2010). Исследования на моделях церебрального амилоидоза без тау-патологии показали, что блокировка сигнального пути CX3CL1-CX3CR1 (лиганд-рецептор) действительно снижает накопление Aβ, оказывая влияние на микроглиальный фагоцитоз внеклеточных Aβ-агрегатов (Lee et al., 2010b; Liu et al., 2010). Таким образом, недостаточность CX3CR1 оказывает разнонаправленное действие на две основных патологических составляющих БА: формирование внеклеточных амилоидных отложений и образование внутриклеточных агрегатов тау-белка (Bhaskar et al., 2010). В данных работах не была проведена оценка функционального состояния животных, в то время как в работе C. Чо с сотрудниками на модели hAPP-J20 было показано, что при удалении CX3CR1 вместе с уменьшением количества амилоидных отложений наблюдается нарушение когнитивной функции, что выявляется при анализе памяти в тестах «пассивное избегание» и «распознавание нового объекта» (Cho et al., 2011).

Еще одним подтверждением гипотезы нейроиммуномодуляции являются эпидемиологические данные, показывающие, что у пациентов, хронически принимающих нестероидные противовоспалительные средства, снижен риск БА (McGeer et al., 2006) и наблюдается значительно менее выраженная манифестация БА. Таким образом, ослабление воспалительного процесса в мозге способствует замедлению развития заболевания (McGeer et al., 1996). Однако проведенные клинические испытания основных нестероидных противовоспалительных средств не показали выраженного эффекта при лечении БА (Rojo et al., 2008). Генетические и эпидемиологические исследования показали, что повышенная выработка TNFα является фактором риска для БА. У пациентов с БА обнаруживается избыток TNFα в цереброспинальной жидкости, а положительный эффект ингибитора TNFα – препарата этанерцепта – указывает на обратимый характер TNFα-зависимого патофизиологического механизма БА и схожих заболеваний (Tobinick, 2010).

8. Новые подходы к лечению БА

Несмотря на огромные усилия и финансовые затраты, направленные на поиск новых эффективных средств для лечения болезни Альцгеймера, за последние 11 лет на рынок не было выведено ни одного нового препарата для лечения этого заболевания. К настоящему времени в клинической практике наиболее активно используются 4 препарата: донепезил (арисепт), галантамин (реминил), ривастигмин (экселон) и мемантин (нооджерон). Три первых являются ингибиторами ацетилхолинэстеразы.

Ингибиторы холинэстераз (ИХЭ) являются исторически первой и наиболее развитой группой препаратов, предложенных для лечения БА. В рамках классических представлений о роли АХЭ в нейромедиаторной передаче считается, что основной эффект ИХЭ связан с увеличением времени действия и концентрации нейромедиатора ацетилхолина (АХ) в межсипаптическом пространстве, за счет чего потенцируется активация холинэргических рецепторов, сниженная при патологии типа БА. Эффективность действия ИХЭ зависит, однако, от целостности пресинаптических нейронов и, очевидно, будет снижаться на более глубоких стадиях заболевания, когда общее количество терминалей холинэргических нейронов резко уменьшается.

Препараты первого поколения ИХЭ, такие как физостигмин и такрин, не селективно ингибировали АХЭ по отношению к другому ферменту этой группы – бутирилхолинэстеразе (БуХЭ), и проявляли низкую органоспецифичность. В настоящее время они практически не применяются, за исключением препарата ипидакрин (нейромидин, амиридин), гепатотоксичность и седативные свойства которого выражены слабее, чем у такрина, что делает его более перспективным в плане хронического применения (Damulin et al., 2011).

Один из примененных подходов к улучшению переносимости препаратов класса ИХЭ предполагал увеличение селективности ингибирования АХЭ по отношению к БуХЭ, что должно было понижать периферическую токсичность этих соединений. Этот принцип были реализован при разработке препаратов ИХЭ второго поколения, таких как арисепт и галантамин, проявляющих выраженную селективность по отношению к АХЭ. Другой подход, успешно воплощенный фирмой Novartis на препарате ривастигмин, заключается в создании веществ с выраженной региоселективностью, обеспечивающей селективное ингибирование АХЭ мозга по сравнению с периферическими формами холинэстераз. Все эти препараты переносятся существенно лучше, чем Такрин, и проявляют определенную эффективность на ранних и умеренных стадиях БА. В последние годы было также показано, что помимо антихолинэргического действия эти препараты влияют на процессинг белка APP и, таким образом, могут иметь определенную перспективу в плане замедления развития нейродегенеративных процессов при БА (Nordberg, 2006). С другой стороны, ИХЭ часто могут приводить к увеличению уровня фосфорилированного tau (Chalmers et al., 2009), что потенциально снижает их терапевтическую привлекательность.

Последнее лекарство, которое было выведено на рынок для лечения умеренных и тяжелых форм БА в 2003 г., – препарат мемантин является неконкурентным

низкоаффинным блокатором внутриканального сайта NMDA-подтипа глутаматных рецепторов. Первоначально считалось, что его когнитивно-стимулирующие свойства обеспечиваются за счет улучшения соотношения сигнал/шум при глутаматэргической передаче нервного импульса благодаря оптимальной потенциал-зависимой блокаде внутриканального сайта NMDA-рецепторов мозга (Danysz et al., 2000). Результаты исследований последних лет позволили предположить, что терапевтический эффект мемантина связан со способностью блокировать токсическое действие β-амилоидного пептида, реализующееся с участием NMDA-рецепторов мозга (Danysz, Parsons, 2012).

В последние годы стратегия поиска препаратов для лечения БА существенно изменилась. Анализ современных подходов к поиску и созданию новых эффективных средств для лечения БА позволяет выявить следующие основные тенденции.

1. Разработка препаратов, действующих на основные стадии патогенеза заболевания (т.н. «болезнь-модифицирующие лекарства»). Такие препараты способны замедлять развитие структурных и функциональных нарушений в ЦНС и давать устойчивое улучшение когнитивных функций (в случае БА), которое сохраняется даже после отмены препарата (Salomone et al., 2012). В случае БА основные направления поиска таких препаратов нацелены на снижение образования и стимулирование удаления основных патоморфологических структурных образований – амилоидных пептидов и нейрофибриллярных клубков. В качестве молекулярных мишеней наибольшее внимание привлекают ферменты формирования и деградации β-амилоидного пептида (β, γ- и α-секретазы), а также ферменты, участвующие в каскаде фосфорилирования тау-белка (Cdk-5). Отдельное внимание привлекает возможность фармакологической коррекции белков системы ApoE как способа удаления патогенных олигомеров β-амилоида.

2. Мультифакторная природа многих НДЗ, в том числе БА, обуславливает интерес к поиску препаратов, действующих одновременно на несколько молекулярных мишеней, участвующих в патогенезе заболевания (т.н. «мультитаргетные препараты») (Carreiras et al., 2013). В качестве таких подходов можно отметить совмещение в одной структуре ингибиторных свойств холинэстеразы и моноаминооксидазы, антиоксидантных и металлохелатирующих свойств, способности выступать лигандами одновременно нескольких рецепторов, введение дополнительных NO-генерирующих фрагментов в базовую структуру лиганда. Примерами таких мультитаргетных агентов являются препарат лагостиджил (Youdim, 2013) и отечетсвенный препарат димебон, успешно прошедший 2-ю фазу клинических испытаний в России (Bharadwaj et al., 2013).

3. Поиск и валидация новых молекулярных мишеней и путей, участвующих в патогенезе заболевания. Так, в последние годы было предложено несколько перспективных подходов к фармакологической коррекции БА, в частности стабилизация функций митохондрий (митопротекторы), блокада патологической агрегации белков при НДЗ (препараты, препятствующие развитию протеинопатии), активация эндогенных механизмов защиты клеток путем стимулирования аутофагии и нейрогенеза. Предложено несколько перспективных групп соединений, реализующих эти механизмы на модельных системах.

Как известно, поиск и создание новых лекарственных препаратов является длительным (10–15 лет) дорогостоящим (сотни миллионов долларов) и рискованным процессом. Так, в области БА за последние 10 лет более 20 препаратов успешно прошли 2-ю фазу клинических испытаний, но ни один не прошел 3-ю фазу. Это связано как с недостаточностью знаний о механизме развития заболеваний (которые часто являются группой близких патологий с различной этиологией), так и с трудностью моделирования на животных сложных НДЗ человека. В этой связи очень привлекательным с точки зрения упрощения прохождения клинических испытаний является исследование возможности использования уже известных препаратов по новому применению. Этот подход, получивший название «репозиционирование лекарств» (Corbett et al., 2012), представляется крайне привлекательным и с инвестиционной точки зрения. Интересно, что изучение случаев успешного применения известных препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний приводит часто к открытию новых фармакологических мишеней.

Отмеченные тенденции хорошо подтверждает анализ базы данных Thomson Reutors (TP). На 1 июня 2014 г. в активной фазе исследований в качестве потенциальных средств, заявленных для лечения БА, находилось 219 синтетических соединений и биологических субстанций. При этом на стадии доклинических исследований было 57 препаратов, на первой фазе клинических испытаний было 53 препарата, на фазах I/II и II – 65 препаратов, на фазах II/III и III было 13 препаратов, стадии пререгистрации проходили 2 препарата. Для 25 препаратов, уже находящихся на рынке по другому применению, в настоящее время проводится изучение возможности их использования для лечения БА. Как уже отмечалось ранее, 4 препарата: арисепт, галантамин, ривастигмин и мемантин, активно применяются в терапии БА. Согласно докладу «Alzheimer's Disease Therapeutics and Diagnostics: World Market 2013–2023», объем мировых продаж лекарственных средств для терапии болезни Альцгеймера к 2017 г. может достичь 8,3 млрд дол. США.

Распределение препаратов по вероятным мишеням действия крайне разнообразно и гетерогенно. Всего для данных препаратов заявлено более 140 вероятных мишеней их действия. Причем для большинства препаратов в качестве вероятной мишени терапевтического действия заявлялась, как правило, несколько мишеней. Но при этом наиболее часто «используемых» мишеней значительно меньше. Так, у примерно 60 препаратов основным объектом действия является система образования и деградации β-амилоидного пептида, на порядок меньше препаратов проходят испытания, имеющие мишенью действия систему тау-белков. Ферменты класса холинэстераз с учетом их новой роли в процессе образования β-амилоидного пептида являются объектом разработки 16 препаратов, а основные рецепторные системы, участвующие в регуляции нейромедиаторных процессов, связанных с формированием памяти и синаптических эффектов амилоидного пепетида (в частности, серотониновые рецепторы, никотиновый α7 и NMDA-рецепторы) используются в качестве мишеней примерно у сорока препаратов. В более чем 70 случаях определенная мишень упоминается только один раз, 20 наиболее часто упоминаемых мишеней вновь разрабатываемых препаратов приведены в табл. 1.

Таблица 1

Мишени для разрабатываемых препаратов против БА

Вероятная мишень действия	Количество препаратов на испытаниях
Белок APP	24
Амилоидный β-пептид	20
Фермент гамма-секретаза (ингибирование)	10
Фермент ацетилхолинэстераза	9
5-HT6 рецептор	8
Фермент бутирилхолинэстераза	7
MAPT (тау) белки	6
5-HT4B рецептор	6
5-HT4 рецептор (не указан подтип)	6
Цитохром P450 3A5	5
NMDA-рецептор	5
β-секретаза	5
Никотиновый α7-рецептор	5
α-секретаза (не указан подтип)	4
Цитохром P450 3A4	4
МАО-Б	4
Мускариновый M1-рецептор	4
Нейротрофический фактор (не указан подтип)	4
Натриевые каналы (не указан подтип)	4
Сигма-1-рецептор	4

Таким образом, наблюдаемые тенденции в поиске новых препаратов для лечения БА и родственных форм деменций подтверждают существующий тренд в конструировании мультитаргетных препаратов, действующих на патогенез заболевания. Вместе с тем, значительных успехов в поиске болезнь-модифицирующих препаратов, действующих на β-амилоидный каскад, достичь пока не удалось. Так, многие соединения, действие которых направлено на блокирование процесса агрегации Аβ, оказались не способны остановить развитие заболевания (Navarrete et al., 2011). Иммунизация против Аβ уменьшает количество амилоидных отложений, но оказывает незначительный эффект на когнитивные функции (Lemere, 2013; Li et al., 2013). Клинические испытания ингибитора γ-секретазы показали его неэффективность (Lleo, Saura, 2011).

Все это привело к появлению альтернативной стратегии поиска терапии БА, направленной на предотвращение нарушений нативной конформации белка тау и компенсацию потери им нормальной функции. Терапевтические подходы к лечению тау-патологии могут быть направлены либо на процесс агрегации, либо на изменение уровня фосфорилирования белка тау. Помимо этого, в качестве препаратов, воздействующих на данное звено патогенеза БА, рассматриваются соединения, способные стабилизировать микротрубочки (Maccioni, 2011; Navarrete et al., 2011). Таким образом, сложилось направление по поиску терапевтических агентов, воздействующих на тау-патию, имеющую место при БА и ряде родственных заболеваний.

В нормальных физиологических условиях белок тау стабилизирует структуру микротрубочек. В настоящий момент считается, что в нейронах пациентов с БА система микротрубочек нарушена, что, в свою очередь, ведет к дефициту аксонального транспорта и дегенерации аксонов, а затем и тел нейронов (Farias et al., 2011). Ряд данных свидетельствует в пользу того, что агрегация тау – это главное событие нейродегенеративного процесса, происходящее вследствие перехода растворимого тау или его олигомеров в нерастворимые филаменты. Этот процесс коррелирует с прогрессированием клинических признаков БА и ухудшением когнитивных способностей (Maccioni et al., 2009). Идентификация мутации в гене, кодирующем тау, у пациентов с семейной ФТД выявила центральную роль тау-патии в патогенезе данного заболевания. На клеточных моделях со сверхэкспрессией тау было показано, что формируемые внутриклеточные агрегаты обладают цитотоксичностью.

В регуляцию процессов укладки и агрегации тау-белка вовлечены различные внутриклеточные белки, которые также могут влиять на выведение агрегатов и молекул с нарушенной конформацией. Убиквитин лигаза CHIP способна полиубиквитинировать тау и, возможно, играет ключевую роль в предотвращении накопления фосфорилированных форм тау и нейрофибриллярных клубков. Существуют данные, что воздействие на CHIP и убиквитин-протеосомную систему может модулировать развитие и прогрессию тау-патологии. Так, белки теплового шока рассматриваются в качестве мишеней для модификации патологического процесса при тау-патиях. Ингибиторы HSP90 уменьшают уровень фосфорилирования тау по определенным сайтам (S396/S404 и S202/T20) и в настоящее время тестируются в качестве противораковых препаратов (Dickey et al., 2007; Fuentes, Catalan, 2011).

Ведется активный поиск низкомолекулярных соединений, способных либо ингибировать образование патологических тау-филаментов, либо дезагрегировать их. В рамках данного подхода рассматривается соединение – хлорид тетраметилтионина, известное как метиленовый синий, для которого была показана способность ингибировать агрегацию белка тау. Фаза II клинических испытаний показала, что хронический прием метиленового синего стабилизирует состояние когнитивной функции у пациентов с БА и выраженность дисфункции по некоторым показателям на 81% ниже в сравнении с группой плацебо (Medina et al., 2011; Wischik et al., 1996). Недавно было показано, что препарат Димебон и ряд его оригинальных аналогов способен влиять на процессы агрегации тау-белков (Peters et al., 2013), что может являться одним из важных элементов его нейропротекторного действия. Исследования, проведенные нами в рамках научной программы «Фундаментальные науки – медицине», на трансгенных мышах линии tau^{P301S}, моделирующих тау-патию, показали, что хроническое применение Димебона замедляет развитие моторной дисфункции у tau-трансгенных мышей. Тестирование проводилось ежемесячно, между третьим и шестым месяцем жизни. Животные, получавшие димебон, показали лучшие результаты при выполнении инструментальных тестов в сравнении с контрольной группой. У контрольных трансгенных животных с возрастом отмечалось прогрессивное накопление нейронов, содержащих гиперфосфорилированные формы tau-белка, в вентральных рогах спинного мозга, тогда как в группе животных, получавших димебон, наблюдалась тенденция к уменьшению

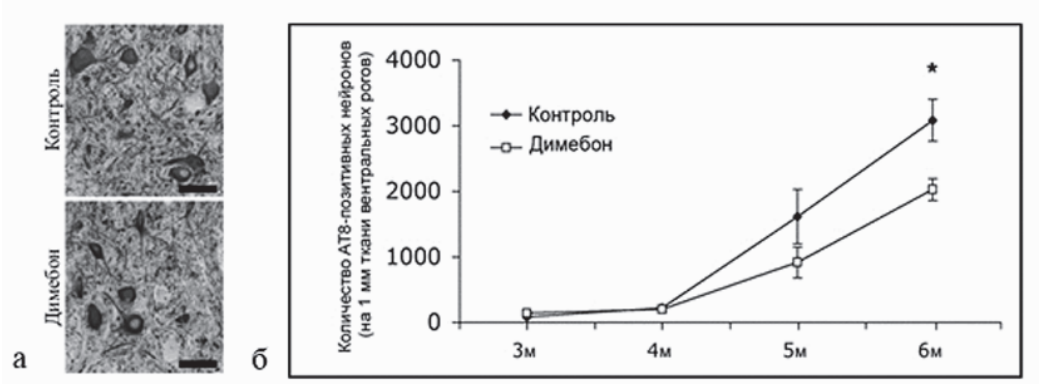


Рис. 5. Количество нейронов, содержащих гиперфосфорилированные формы белка тау, в опытных и контрольных группах трансгенных животных tau^{P301S}

а – иммуногистохимеческая окраска антителами AT8 срезов грудного отдела спинного мозга tau^{P301S}-мышей; б – результаты для димебона (* – $p<0,05$)

количества таких нейронов, а к шестому месяцу жизни эти различия становились статистически достоверными (рис. 5).

Общее количество гиперфосфорилированного белка tau в спинном мозге опытных животных к шестому месяцу наблюдения было значимо меньше по сравнению с контрольной группой. Нейропротекторное действие димебона в условиях развития нейродегенеративного процесса было также показано на трансгенных животных (линия Thy1mγSN), моделирующих протеинопатию, связанную с патологической агрегацией другого белка – γ-синуклеина (Bachurin et al., 2012). Димебон существенно замедлял развитие нарушений баланса и координации, являющихся типичными проявлениями патологии в использованной модели протеинопатии. Гистологическое исследование срезов спинного мозга двенадцатимесячных животных, которые получали димебон в течение шести месяцев, показал значительное уменьшение числа окрашиваемых Конго красным амилоидных отложений по сравнению с животными такого же возраста, которые не получали препарата (рис. 6). Таким образом, полученные данные говорят в пользу того, что димебон может быть использован в качестве основы для разработки патогенетической терапии ряда нейродегенеративных заболеваний, которые относятся к группе протеинопатий.

Развитие как острых, так и медленнотекущих нейродегенеративных заболеваний сопровождается массовой гибелью клеток нервной системы. Необходимым компонентом комплексной терапии нейродегенеративных заболеваний представляется репарация поврежденных или уже утерянных клеточных структур, что теоретически может быть достигнуто стимуляцией регенеративных процессов в нейрогенных зонах мозга. Ведутся активные исследования по разработке соединений, способных стимулировать пролиферацию и дифференцировку нейрональных клеток в субвентрикулярной зоне и зубчатой фасции взрослого мозга для лечения распространенных нейродегенеративных заболеваний, таких как БА, боковой амиотрофический склероз и др. (Кубатиев, Пальцын, 2012; De Jesus-Cortes et al., 2012;

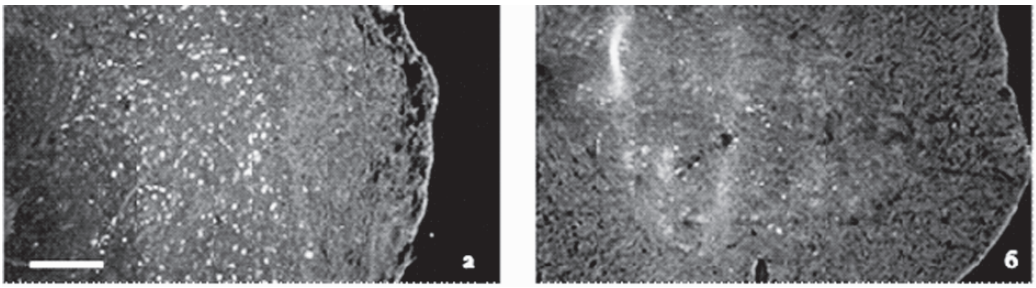


Рис. 6. Влияние хронического применения Димебона на число амилоидных включений в переднем роге грудного отдела спинного мозга Thy1mγSN мышей

а – спинной мозг контрольных трансгенных животных, б – спинной мозг трансгенных животных, получавших Димебон. Окраска Конго красным, шкала – 100 мкм

Pieper et al., 2010; Tesla et al., 2012). Дальнейшие исследования покажут перспективность таких подходов для лечения БА и других деменций.

Литература

Бачурин С.О. Медико-химические подходы к направленному поиску препаратов для лечения и предупреждения болезни Альцгеймера // Вопросы медицинской химии. 2001. Вып. 47. № 2. С. 155-197.

Завалишин И.А., Яхно Н.Н., Гаврилов С.И. Нейродегенеративные болезни и старение. Руководство для врачей. Ред. И.А. Завалишин, Н.Н. Яхно, С.И. Гаврилов. М., 2001. 454 с.

Кубатиев А.А., Пальцын А.А. Внутриклеточная регенерация мозга: новый взгляд // Вестник РАМН. 2012. Вып. 8. С. 21-25.

Шевцова Е.Ф., Киреева Е.Г., Бачурин С.О. Влияние фрагмента бета-амилоидного пептида 25-35 на неселективную проницаемость митохондрий // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2001. Вып. 132. № 12. С. 652-656.

Шелковникова Т.А., Куликова А.А., Цветков Ф.О., Петерс О., Бачурин С.О., Бухман В.Л., Нинкина Н.Н. Протеинопатии – формы нейродегенеративных заболеваний, в основе которых лежит патологическая агрегация белков // Молекулярная биология. 2012. Вып. 46. № 3. С. 402-415.

http://www.jnj.com. Johnson & Johnson announces discontinuation of phase 3 development of bapineuzumab intravenous (IV) in mild-to-moderate alzheimer's disease. URL: http://www.jnj.com/news/product/johnson-and-johnson-announces-discontinuation-of-phase-3-development-of-bapineuzumab-intravenous-iv-in-mild-to-moderate-alzheimers-disease.

Aizenstein H.J., Nebes R.D., Saxton J.A., Price J.C. et al. Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly // Arch. Neurol. 2008. Vol. 65. № 11. P. 1509-1517.

Allen B., Ingram E., Takao M., Smith M.J. et al. Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein // J. Neurosci. 2002. Vol. 22. № 21. P. 9340-9351.

Alvarez A., Munoz J.P., Maccioni R.B. A Cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of Cdk5 activity in hippocampal neurons // Exp. Cell. Res. 2001. Vol. 264. № 2. P. 266-274.

Bachurin S.O., Shelkovnikova T.A., Ustyugov A.A., Peters O. et al. Dimebon slows progression of proteinopathy in gamma-synuclein transgenic mice // Neurotox. Res. 2012. Vol. 22. № 1. P. 33-42.

Bales K.R., Verina T., Cummins D.J., Du Y. et al. Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP(V717F) transgenic mouse model of Alzheimer's disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. № 26. P. 15233-15238.

Bharadwaj P.R., Bates K.A., Porter T. et al. Latrepirdine: molecular mechanisms underlying potential therapeutic roles in Alzheimer's and other neurodegenerative diseases // Transl. Psychiatry. 2013. Vol. 3. P. e332.

Bhaskar K., Konerth M., Kokiko-Cochran O.N., Cardona A., Ransohoff R.M., Lamb B.T. Regulation of tau pathology by the microglial fractalkine receptor // Neuron. 2010. Vol. 68. № 1. P. 19-31.

Biernat J., Gustke N., Drewes G., Mandelkow E.M., Mandelkow E. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding // Neuron. 1993. Vol. 11. № 1. P. 153-163.

Billings L.M., Oddo S., Green K.N., McGaugh J.L., LaFerla F.M. Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice // Neuron. 2005. Vol. 45. № 5. P. 675-688.

Borchelt D.R., Ratovitski T., van Lare J. et al. Accelerated amyloid deposition in the brains of transgenic mice coexpressing mutant presenilin 1 and amyloid precursor proteins // Neuron. 1997. Vol. 19. № 4. P. 939-945.

Bramblett G.T., Goedert M., Jakes R., Merrick S.E., Trojanowski J.Q., Lee V.M. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding // Neuron. 1993. Vol. 10. № 6. P. 1089-1099.

Brookmeyer R., Gray S., Kawas C. Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset // Am. J. Public. Health. 1998. Vol. 88. № 9. P. 1337-1342.

Carreiras M.C., Mendes E., Perry M.J., Francisco A.P., Marco-Contelles J. The multifactorial nature of Alzheimer's disease for developing potential therapeutics // Curr. Top. Med. Chem. 2013. Vol. 13. № 15. P. 1745-1770.

Chalmers K.A., Wilcock G.K., Vinters H.V. et al. Cholinesterase inhibitors may increase phosphorylated tau in Alzheimer's disease // J. Neurol. 2009. Vol. 256. № 5. P. 717-720.

Chartier-Harlin M.C., Crawford F., Houlden H. et al. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene // Nature. 1991. Vol. 353. № 6347. P. 844-846.

Cho S.H., Sun B., Zhou Y., Kauppinen T.M., Halabisky B., Wes P., Ransohoff R.M., Gan L. CX3CR1 protein signaling modulates microglial activation and protects against plaque-independent cognitive deficits in a mouse model of Alzheimer disease // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286. № 37. P. 32713-32722.

Corbett A., Pickett J., Burns A., Corcoran J. et al. Drug repositioning for Alzheimer's disease // Nat. Rev. Drug. Discov. 2012. Vol. 11. № 11. P. 833-846.

Czapski G.A., Gassowska M., Songin M., Radecka U.D., Strosznajder J.B. Alterations of cyclin dependent kinase 5 expression and phosphorylation in amyloid precursor protein (APP)-transfected PC12 cells // FEBS Lett. 2011. Vol. 585. № 8. P. 1243-1248.

Damulin I.V., Stepkina D.A., Lokshina A.B. Neuromidin in mixed vascular and Alzheimer's dementia // Zh. Nevrol. Psikhiatr. im. S.S. Korsakova. 2011. Vol. 111. № 2. P. 40-43.

Danysz W., Parsons C.G. Alzheimer's disease, beta-amyloid, glutamate, NMDA receptors and memantine--searching for the connections // Br. J. Pharmacol. 2012. Vol. 167. № 2. P. 324-352.

Danysz W., Parsons C.G., Mobius H.J., Stoffler A., Quack G. Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease – a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action // Neurotox. Res. 2000. Vol. 2. № 2-3. P. 85-97.

Dawkins E., Small D.H. Insights into the physiological function of the beta-amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease // J. Neurochem. 2014. Vol. 10. 1111/jnc.12675.

De Jesus-Cortes H., Xu P., Drawbridge J., Estill S.J. et al. Neuroprotective efficacy of aminopropyl carbazoles in a mouse model of Parkinson disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. Vol. 109. № 42. P. 17010-17015.

DeKosky S.T., Scheff S.W. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity // Ann. Neurol. 1990. Vol. 27. № 5. P. 457-464.

Delacourte A., Sergeant N., Wattez A., Gauvreau D., Robitaille Y. Vulnerable neuronal subsets in Alzheimer's and Pick's disease are distinguished by their tau isoform distribution and phosphorylation // Ann. Neurol. 1998. Vol. 43. № 2. P. 193-204.

DiCarlo G., Wilcock D., Henderson D., Gordon M., Morgan D. Intrahippocampal LPS injections reduce Abeta load in APP+PS1 transgenic mice // Neurobiol. Aging. 2001. Vol. 22. № 6. P. 1007-1012.

Dickey C.A., Kamal A., Lundgren K., Klosak N. et al. The high-affinity HSP90-CHIP complex recognizes and selectively degrades phosphorylated tau client proteins // J. Clin. Invest. 2007. Vol. 117. № 3. P. 648-658.

Esch F.S., Keim P.S., Beattie E.C. et al. Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor // Science. 1990. Vol. 248. № 4959. P. 1122-1124.

Extance A. Alzheimer's failure raises questions about disease-modifying strategies // Nat. Rev. Drug. Discov. 2010. Vol. 9. № 10. P. 749-751.

Farias G., Cornejo A., Jimenez J., Guzman L., Maccioni R.B. Mechanisms of tau self-aggregation and neurotoxicity // Curr. Alzheimer. Res. 2011. Vol. 8. № 6. P. 608-614.

Fernandez J.A., Rojo L., Kuljis R.O., Maccioni R.B. The damage signals hypothesis of Alzheimer's disease pathogenesis // J. Alzheimers. Dis. 2008. Vol. 14. № 3. P. 329-333.

Fuentes P., Catalan J. A clinical perspective: anti tau's treatment in Alzheimer's disease // Curr. Alzheimer Res. 2011. Vol. 8. № 6. P. 686-688.

Fuhrmann M., Bittner T., Jung C.K. et al. Microglial Cx3cr1 knockout prevents neuron loss in a mouse model of Alzheimer's disease // Nat. Neurosci. 2010. Vol. 13. № 4. P. 411-413.

Games D., Adams D., Alessandrini R. et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein // Nature. 1995. Vol. 373. № 6514. P. 523-527.

Gebicke-Haerter P.J. Microglia in neurodegeneration: molecular aspects // Microsc. Res. Tech. 2001. Vol. 54. № 1. P. 47-58.

Giasson B.I., Lee V.M., Trojanowski J.Q. Interactions of amyloidogenic proteins // Neuromolecular. Med. 2003. Vol. 4. № 1-2. P. 49-58.

Glatz D.C., Rujescu D., Tang Y., Berendt F.J. et al. The alternative splicing of tau exon 10 and its regulatory proteins CLK2 and TRA2-BETA1 changes in sporadic Alzheimer's disease // J. Neurochem. 2006. Vol. 96. № 3. P. 635-644.

Glenner G.G., Wong C.W. Alzheimer's disease and Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1984. Vol. 122. № 3. P. 1131-1135.

Goate A. Segregation of a missense mutation in the amyloid beta-protein precursor gene with familial Alzheimer's disease // J. Alzheimers Dis. 2006. Vol. 9. № 3. Suppl. P. 341-347.

Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M. et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease // Nature. 1991. Vol. 349. № 6311. P. 704-706.

Goedert M., Wischik C.M., Crowther R.A., Walker J.E., Klug A. Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. Vol. 85. № 11. P. 4051-4055.

Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R., Rutherford D., Crowther R.A. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease // Neuron. 1989. Vol. 3. № 4. P. 519-526.

Goedert M., Spillantini M.G., Cairns N.J., Crowther R.A. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms // Neuron. 1992. Vol. 8. № 1. P. 159-168.

Good P.F., Werner P., Hsu A., Olanow C.W., Perl D.P. Evidence of neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease // Am. J. Pathol. 1996. Vol. 149. № 1. P. 21-28.

Gorlovoy P., Larionov S., Pham T.T., Neumann H. Accumulation of tau induced in neurites by microglial proinflammatory mediators // FASEB J. 2009. Vol. 23. № 8. P. 2502-2513.

Gotz J., Probst A., Spillantini M.G., Schafer T., Jakes R., Burki K., Goedert M. Somatodendritic localization and hyperphosphorylation of tau protein in transgenic mice expressing the longest human brain tau isoform // EMBO J. 1995. Vol. 14. № 7. P. 1304-1313.

Gotz J., Chen F., van Dorpe J., Nitsch R.M. Formation of neurofibrillary tangles in P301l tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils // Science. 2001. Vol. 293. № 5534. P. 1491-1495.

Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Quinlan M., Tung Y.C., Zaidi M.S., Wisniewski H.M. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments // J. Biol. Chem. 1986a. Vol. 261. № 13. P. 6084-6089.

Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y.C. et al. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986b. Vol. 83. № 13. P. 4913-4917.

Haass C., Schlossmacher M.G., Hung A.Y. et al. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism // Nature. 1992. Vol. 359. № 6393. P. 322-325.

Hansen L.A., Masliah E., Galasko D., Terry R.D. Plaque-only Alzheimer disease is usually the lewy body variant, and vice versa // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1993. Vol. 52. № 6. P. 648-654.

Hardy J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal // J. Neurochem. 2009. Vol. 110. № 4. P. 1129-1134.

Hardy J., Selkoe D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics // Science. 2002. Vol. 297. № 5580. P. 353-356.

Heber S., Herms J., Gajic V. et al. Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members // J. Neurosci. 2000. Vol. 20. № 21. P. 7951-7963.

Herber D.L., Mercer M., Roth L.M. et al. Microglial activation is required for Abeta clearance after intracranial injection of lipopolysaccharide in APP transgenic mice // J. Neuroimmune. Pharmacol. 2007. Vol. 2. № 2. P. 222-231.

Herber D.L., Roth L.M., Wilson D. et al. Time-dependent reduction in Abeta levels after intracranial LPS administration in APP transgenic mice // Exp. Neurol. 2004. Vol. 190. № 1. P. 245-253.

Hernandez P., Lee G., Sjoberg M., Maccioni R.B. Tau phosphorylation by cdk5 and Fyn in response to amyloid peptide Abeta (25-35): involvement of lipid rafts // J. Alzheimers. Dis. 2009. Vol. 16. № 1. P. 149-156.

Holcomb L., Gordon M.N., McGowan E. et al. Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes // Nat. Med. 1998. Vol. 4. № 1. P. 97-100.

Hoover B.R., Reed M.N., Su J. et al. Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration // Neuron. 2010. Vol. 68. № 6. P. 1067-1081.

Hsia A.Y., Masliah E., McConlogue L. et al. Plaque-independent disruption of neural circuits in Alzheimer's disease mouse models // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. № 6. P. 3228-3233.

Hsiao K., Chapman P., Nilsen S., Eckman C. et al. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice // Science. 1996. Vol. 274. № 5284. P. 99-102.

Hutton M., Lendon C.L., Rizzu P. et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17 // Nature. 1998. Vol. 393. № 6686. P. 702-705.

Janke C., Beck M., Stahl T., Holzer M. et al. Phylogenetic diversity of the expression of the microtubule-associated protein tau: implications for neurodegenerative disorders // Brain. Res. Mol. Brain. Res. 1999. Vol. 68. № 1-2. P. 119-128.

*Jorissen E., Prox J., Bernreuther C., Weber S. et al.*The disintegrin/metalloproteinase ADAM10 is essential for the establishment of the brain cortex // J. Neurosci. 2010. Vol. 30. № 14. P. 4833-4844.

Khlistunova I., Biernat J., Wang Y. et al. Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281. № 2. P. 1205-1214.

Kitazawa M., Oddo S., Yamasaki T.R., Green K.N., LaFerla F.M. Lipopolysaccharide-induced inflammation exacerbates tau pathology by a cyclin-dependent kinase 5-mediated pathway in a transgenic model of Alzheimer's disease // J. Neurosci. 2005. Vol. 25. № 39. P. 8843-8853.

Klunk W.E., Perani D. Amyloid and neurodegeneration: Converging and diverging paths // Neurology. – 2013. 10.1212/01.wnl.0000435568.38352.2e.

Kocherhans S., Madhusudan A., Doehner J. et al. Reduced Reelin expression accelerates amyloid-beta plaque formation and tau pathology in transgenic Alzheimer's disease mice // J. Neurosci. 2010. Vol. 30. № 27. P. 9228-9240.

Kuhn P.H., Wang H., Dislich B. et al. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons // EMBO J. 2010. Vol. 29. № 17. P. 3020-3032.

LaFerla F.M., Oddo S. Alzheimer's disease: Abeta, tau and synaptic dysfunction // Trends Mol. Med. 2005. Vol. 11. № 4. P. 170-176.

Lee V.M., Goedert M., Trojanowski J.Q. Neurodegenerative tauopathies // Annu. Rev. Neurosci. 2001. Vol. 24. P. 1121-1159.

Lee H.G., Perry G., Moreira P.I., Garrett M.R. et al. Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? // Trends Mol. Med. 2005. Vol. 11. № 4. P. 164-169.

Lee D.C., Rizer J., Selenica M.L. et al. LPS-induced inflammation exacerbates phospho-tau pathology in rTg4510 mice // J. Neuroinflammation. 2010a. Vol. 7. P. 56.

Lee S., Varvel N.H., Konerth M.E., Xu G. et al. CX3CR1 deficiency alters microglial activation and reduces beta-amyloid deposition in two Alzheimer's disease mouse models // Am. J. Pathol. 2010b. Vol. 177. № 5. P. 2549-2562.

Lemere C.A. Immunotherapy for Alzheimer's disease: hoops and hurdles // Mol. Neurodegener. 2013. Vol. 8. № 1. P. 36.
Lewis J., McGowan E., Rockwood J. et al. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein // Nat. Genet. 2000. Vol. 25. № 4. P. 402-405.
Li Y., Liu L., Barger S.W., Griffin W.S. Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway // J. Neurosci. 2003. Vol. 23. № 5. P. 1605-1611.
Li Y., Liu Y., Wang Z., Jiang Y. Clinical trials of amyloid-based immunotherapy for Alzheimer's disease: end of beginning or beginning of end? // Expert. Opin. Biol. Ther. 2013. Vol. 13. № 11. P. 1515-1522.
Liu Z., Condello C., Schain A., Harb R., Grutzendler J. CX3CR1 in microglia regulates brain amyloid deposition through selective protofibrillar amyloid-beta phagocytosis // J. Neurosci. 2010. Vol. 30. № 50. P. 17091-17101.
Lleo A., Saura C.A. Gamma-secretase substrates and their implications for drug development in Alzheimer's disease // Curr. Top. Med. Chem. 2011. Vol. 11. № 12. P. 1513-1527.
Lucin K.M., Wyss-Coray T. Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? // Neuron. 2009. Vol. 64. № 1. P. 110-122.
Lue L.F., Kuo Y.M., Roher A.E. et al. Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease // Am. J. Pathol. 1999. Vol. 155. № 3. P. 853-862.
Ma Q.L., Yang F., Rosario E.R., Ubeda O.J. et al. Beta-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by omega-3 fatty acids and curcumin // J. Neurosci. 2009. Vol. 29. № 28. P. 9078-9089.
Maatuk N., Samson A.O. Modeling the binding mechanism of Alzheimer's Abeta1-42 to nicotinic acetylcholine receptors based on similarity with snake alpha-neurotoxins // Neurotoxicology. 2013. Vol. 34. P. 236-242.
Maccioni R.B. Tau protein in Alzheimer's disease // Curr. Alzheimer. Res. 2011. Vol. 8. № 6. P. 607.
Maccioni R.B., Perry G. – eds. Current hypotheses and research milestones in Alzheimer's disease. NY: Springer, 2009. 247 p.
Maccioni R.B., Rojo L.E., Fernandez J.A., Kuljis R.O. The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease // Ann. NY. Acad. Sci. 2009. Vol. 1153. P. 240-246.
Maccioni R.B., Farias G., Morales I., Navarrete L. The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease // Arch. Med. Res. 2010. Vol. 41. № 3. P. 226-231.
Masliah E., Mallory M., Alford M. et al. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease // Neurology. 2001. Vol. 56. № 1. P. 127-129.
McGeer P.L., Schulzer M., McGeer E.G. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiologic studies // Neurology. 1996. Vol. 47. № 2. P. 425-432.
McGeer P.L., Rogers J., McGeer E.G. Inflammation, anti-inflammatory agents and Alzheimer disease: the last 12 years // J. Alzheimers. Dis. 2006. Vol. 9. № 3. Suppl. P. 271-276.
Medina D.X., Caccamo A., Oddo S. Methylene blue reduces abeta levels and rescues early cognitive deficit by increasing proteasome activity // Brain. Pathol. 2011. Vol. 21. № 2. P. 140-149.
Morales I., Farias G., Maccioni R.B. Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease // Neuroimmunomodulation. 2010. Vol. 17. № 3. P. 202-204.
Muller U., Cristina N., Li Z.W. et al. Behavioral and anatomical deficits in mice homozygous for a modified beta-amyloid precursor protein gene // Cell. 1994. Vol. 79. № 5. P. 755-765.
Mungarro-Menchaca X., Ferrera P., Moran J., Arias C. Beta-amyloid peptide induces ultrastructural changes in synaptosomes and potentiates mitochondrial dysfunction in the presence of ryanodine // J. Neurosci. Res. 2002. Vol. 68. № 1. P. 89-96.
Navarrete L.P., Perez P., Morales I., Maccioni R.B. Novel drugs affecting tau behavior in the treatment of Alzheimer's disease and tauopathies // Curr. Alzheimer Res. 2011. Vol. 8. № 6. P. 678-685.
Nordberg A. Mechanisms behind the neuroprotective actions of cholinesterase inhibitors in Alzheimer disease // Alzheimer Dis. Assoc. Disord. 2006. Vol. 20. № 2. Suppl. 1. P. S12-18.
Nussbaum J.M., Seward M.E., Bloom G.S. Alzheimer disease: a tale of two prions // Prion. 2013. Vol. 7. № 1. P. 14-19.

Oddo S., Caccamo A., Shepherd J.D. et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction // Neuron. 2003. Vol. 39. № 3. P. 409-421.

Oddo S., Billings L., Kesslak J.P., Cribbs D.H., LaFerla F.M. Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome // Neuron. 2004. Vol. 43. № 3. P. 321-332.

Oddo S., Vasilevko V., Caccamo A. et al. Reduction of soluble Abeta and tau, but not soluble Abeta alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281. № 51. P. 39413-39423.

Otth C., Mendoza-Naranjo A., Mujica L., Zambrano A., Concha, II, Maccioni R.B. Modulation of the JNK and p38 pathways by cdk5 protein kinase in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease // Neuroreport. 2003. Vol. 14. № 18. P. 2403-2409.

Panza F., Frisardi V., Imbimbo B.P. et al. Anti-beta-amyloid immunotherapy for Alzheimer's disease: focus on bapineuzumab // Curr. Alzheimer Res. 2011. Vol. 8. № 8. P. 808-817.

Perry V.H., Nicoll J.A., Holmes C. Microglia in neurodegenerative disease // Nat. Rev. Neurol. 2010. Vol. 6. № 4. P. 193-201.

Peters O.M., Connor-Robson N., Sokolov V.B. et al. Chronic administration of dimebon ameliorates pathology in TauP301S transgenic mice // J. Alzheimers Dis. 2013. Vol. 33. № 4. P. 1041-1049.

Pieper A.A., Xie S., Capota E., Estill S.J. et al. Discovery of a proneurogenic, neuroprotective chemical // Cell. 2010. Vol. 142. № 1. P. 39-51.

Quinn J., Montine T., Morrow J., Woodward W.R., Kulhanek D., Eckenstein F. Inflammation and cerebral amyloidosis are disconnected in an animal model of Alzheimer's disease // J. Neuroimmunol. 2003. Vol. 137. № 1-2. P. 32-41.

Quintanilla R.A., Orellana D.I., Gonzalez-Billault C., Maccioni R.B. Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway // Exp. Cell. Res. 2004. Vol. 295. № 1. P. 245-257.

Reddy P.H., Beal M.F. Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease // Trends Mol. Med. 2008. Vol. 14. № 2. P. 45-53.

Rinne J.O., Brooks D.J., Rossor M.N. et al. 11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study // Lancet. Neurol. 2010. Vol. 9. № 4. P. 363-372.

Rojo L.E., Fernandez J.A., Maccioni A.A., Jimenez J.M., Maccioni R.B. Neuroinflammation: implications for the pathogenesis and molecular diagnosis of Alzheimer's disease // Arch. Med. Res. 2008. Vol. 39. № 1. P. 1-16.

Saez T.E., Pehar M., Vargas M., Barbeito L., Maccioni R.B. Astrocytic nitric oxide triggers tau hyperphosphorylation in hippocampal neurons // In Vivo. 2004. Vol. 18. № 3. P. 275-280.

Salomone S., Caraci F., Leggio G.M., Fedotova J., Drago F. New pharmacological strategies for treatment of Alzheimer's disease: focus on disease modifying drugs // Br. J. Clin. Pharmacol. 2012. Vol. 73. № 4. P. 504-517.

Santacruz K., Lewis J., Spires T. et al. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function // Science. 2005. Vol. 309. № 5733. P. 476-481.

Scheuner D., Eckman C., Jensen M. et al. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease // Nat. Med. 1996. Vol. 2. № 8. P. 864-870.

Selkoe D.J. The molecular pathology of Alzheimer's disease // Neuron. 1991. Vol. 6. № 4. P. 487-498.

Selkoe D.J. Alzheimer's disease is a synaptic failure // Science. 2002. Vol. 298. № 5594. P. 789-791.

Sergeant N., Wattez A., Delacourte A. Neurofibrillary degeneration in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration: tau pathologies with exclusively «exon 10» isoforms // J. Neurochem. 1999. Vol. 72. № 3. P. 1243-1249.

Seubert P., Oltersdorf T., Lee M.G. et al. Secretion of beta-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the beta-amyloid peptide // Nature. 1993. Vol. 361. № 6409. P. 260-263.

Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y. et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease // Nature. 1995. V. 375. № 6534. P. 754-760.

Sinha S., Lieberburg I. Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. № 20. P. 11049-11053.

Smith M.A., Perry G., Richey P.L., Sayre L.M., Anderson V.E., Beal M.F., Kowall N. Oxidative damage in Alzheimer's // Nature. 1996. Vol. 382. № 6587. P. 120-121.

Spillantini M.G., Murrell J.R., Goedert M., Farlow M.R., Klug A., Ghetti B. Mutation in the tau gene in familial multiple system tauopathy with presenile dementia // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. № 13. P. 7737-7741.

Tai H.C., Serrano-Pozo A., Hashimoto T. et al. The synaptic accumulation of hyperphosphorylated tau oligomers in Alzheimer disease is associated with dysfunction of the ubiquitin-proteasome system // Am. J. Pathol. 2012. Vol. 181. № 4. P. 1426-1435.

Terry R.D., Masliah E., Salmon D.P. et al. Physical basis of cognitive alterations in Alzheimer's disease: synapse loss is the major correlate of cognitive impairment // Ann. Neurol. 1991. Vol. 30. № 4. P. 572-580.

*Tesla R., Wolf H.P., Xu P., Drawbridge J. et al. N*europrotective efficacy of aminopropyl carbazoles in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012. Vol. 109. № 42. P. 17016-17021.

Thies W., Bleiler L. Alzheimer's A. Alzheimer's disease facts and figures // Alzheimers Dement. 2013. Vol. 9. № 2. P. 208-245.

Tobinick E. Perispinal etanercept: a new therapeutic paradigm in neurology // Expert. Rev. Neurother. 2010. Vol. 10. № 6. P. 985-1002.

Tokutake T., Kasuga K., Yajima R., Sekine Y., Tezuka T., Nishizawa M., Ikeuchi T. Hyperphosphorylation of Tau induced by naturally secreted amyloid-beta at nanomolar concentrations is modulated by insulin-dependent Akt-GSK3beta signaling pathway // J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287. № 42. P. 35222-35233.

Vellas B., Carrillo M.C., Sampaio C. et al. Designing drug trials for Alzheimer's disease: What we have learned from the release of the phase III antibody trials: A report from the EU/US/CTAD Task Force // Alzheimers Dement. 2013. Vol. 9. № 4. P. 438-444.

Walker L.C., Diamond M.I., Duff K.E., Hyman B.T. Mechanisms of protein seeding in neurodegenerative diseases // JAMA Neurol. 2013. Vol. 70. № 3. P. 304-310.

Walsh D.M., Selkoe D.J. A beta oligomers – a decade of discovery // J. Neurochem. 2007. Vol. 101. № 5. P. 1172-1184.

Wang H.Y., Li W., Benedetti N.J., Lee D.H. Alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors mediate beta-amyloid peptide-induced tau protein phosphorylation // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. № 34. P. 31547-31553.

Wasco W., Bupp K., Magendantz M., Gusella J.F., Tanzi R.E., Solomon F. Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. № 22. P. 10758-10762.

Wischik C.M., Edwards P.C., Lai R.Y., Roth M., Harrington C.R. Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. № 20. P. 11213-11218.

Yoshiyama Y., Higuchi M., Zhang B. et al. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model // Neuron. 2007. Vol. 53. № 3. P. 337-351.

Youdim M.B. Multi target neuroprotective and neurorestorative anti-Parkinson and anti-Alzheimer drugs ladostigil and m30 derived from rasagiline // Exp. Neurobiol. 2013. Vol. 22. № 1. P. 1-10.

Zheng H., Jiang M., Trumbauer M.E. et al. Beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity // Cell. 1995. Vol. 81. № 4. P. 525-531.

Zilka N., Stozicka Z., Kovac A., Pilipcinec E., Bugos O., Novak M. Human misfolded truncated tau protein promotes activation of microglia and leukocyte infiltration in the transgenic rat model of tauopathy // J. Neuroimmunol. 2009. Vol. 209. № 1-2. P. 16-25.

Патогенез болезни Альцгеймера и кальциевый гомеостаз

М.А. Рязанцева, Г.Н. Можаева, Е.В. Казначеева

Содержание

1. Введение
2. Гены, ассоциированные с болезнью Альцгеймера. Наследственная болезнь Альцгеймера
3. Трансгенные мыши как модель наследственной болезни Альцгеймера
4. Роль амилоида-β в болезни Альцгеймера
5. Кальциевая гипотеза болезни Альцгеймера
6. Мутации в гене белка пресенилин-1 приводят к нарушению гомеостаза кальция
7. Белок пресенилин-1 работает как канал «утечки» кальция из эндоплазматического ретикулума
8. Изменения активности депо-управляемых и потенциал-управляемых кальциевых каналов, связанные с мутациями в гене белка PS1
9. Заключение

1. Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее распространенным нейродегенеративным заболеванием, характеризующимся постепенной потерей памяти и когнитивных способностей. Этиология БА до конца не изучена. В связи с этим не существует эффективного лечения этого заболевания. Различные гипотезы, объясняющие природу патологии БА, приводили к разработке соответствующих лекарств, но, несмотря на десятилетия исследований и клинических испытаний, имеющиеся в использовании препараты в лучшем случае способны замедлять прогрессию заболевания, но не способны вылечить саму болезнь. В данной работе рассматривается одна из современных гипотез патогенеза БА, по которой нарушение кальциевого гомеостаза является ключевым событием для развития нейродегенеративных процессов.

Развитие БА связано с обширной потерей синапсов и гибелью нейронов в области гиппокампа и коры больших полушарий. При БА происходит значительная атрофия гиппокампа (более 60% нейронов в CA1-секторе) с ассоциированным селективным расширением смежного височного рога латерального желудочка. Массовое отмирание нейронов происходит также в неокортексе. До 90% нейронов гиб-

---

Сокращения: БА – болезнь Альцгеймера; БЛМ – бислойных липидных мембран; НБА – наследственная форма болезни Альцгеймера; α_7-nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор; Аβ – амилоид-β; Аβ40 – 40 аминокислотный экстраклеточный фрагмент амилоида-β; Аβ42 – 42-аминокислотный экстраклеточный фрагмент амилоида-β; *ApoE* – аполипопротеин Е; APP – предшественник амилоида; *PSEN1* – пресенилин-1; *PSEN2* – пресенилин-2.

нет в энторинальной области коры больших полушарий, верхней височной извилине и надкраевой извилине. Смерть нейронов происходит также в обонятельной луковице, миндалевидном теле и голубоватом пятне (Duyckaerts et al., 2009).

Одним из главных диагностических признаков БА является наличие нейрофибриллярных узелков и амилоидных бляшек в тканях головного мозга. Главный компонент амилоидных бляшек – амилоид-β (Aβ). Aβ образуется в результате разрезания трансмембранного белка-предшественника амилоида (APP) ферментами секретазами (Nunan, Smal, 2000). Существует 2 изоформы Aβ у человека – пептид длиной 40 аминокислот (Aβ40) и пептид длиной 42 аминокислоты (Aβ42). Оба пептида способны олигомеризоваться и образовывать нерастворимые амилоидные бляшки, Aβ42, тем не менее, более склонен к олигомеризации. Изоформы Aβ40 и Aβ42 также встречаются у человека в норме и образуют амилоидные бляшки в стареющем мозге (Goedert, Spillantini, 2006). Однако в мозге пациентов с БА происходит более интенсивное образование амилоидных бляшек, и распределение их в мозге не является случайным и зависит от стадии заболевания: преимущественно поражаются неокортекс и гиппокамп (Duyckaerts et al., 2009). При БА происходит либо изменение соотношения Aβ42:Aβ40 за счет увеличения количества фрагмента Aβ42 или уменьшения количества Aβ40, либо увеличение количества обеих изоформ (Demuro et al., 2010; Kuperstein et al., 2010). Нейрофибриллярные узелки образуются в цитоплазме нейронов и состоят из нерастворимых агрегатов гиперфосфорилированного белка тау. Накопление гиперфосфорилированного белка тау происходит как в сомато-дендритной области, так и в аксонах (Duyckaerts et al., 2009).

Таким образом, важной задачей является поиск новых мишеней для разработки терапии БА (Ballard et al., 2011; Fan, Chiu, 2010).

2. Гены, ассоциированные с болезнью Альцгеймера. Наследственная болезнь Альцгеймера

Большинство случаев БА являются спорадическими и характеризуются поздним проявлением симптомов – в возрасте от 60–65 лет. Несмотря на то что близнецовый метод указывает на генетическую причину БА с поздним проявлением симптомов, ген, ассоциированный с этим заболеванием, так и не был обнаружен (Bekris et al., 2010). Единственный ген, чья связь со спорадической формой БА была доказана, – это *ApoE* (аполипопротеин Е) (Roses, 2006; Coon et al., 2007). Однако даже носители аллели *ApoEε4*, которая увеличивает риск развития заболевания в 3 раза, а в случае гомозиготы по данной аллели – в 12 раз, могут дожить до 90 лет без каких-либо признаков заболевания (Bekris et al., 2010). Это дает основания предполагать, что дополнительным фактором служат либо внешние условия, либо другие гены. На данный момент как возможные факторы риска развития спорадической формы БА рассматриваются более 10 генов. Полный список исследуемых генов, предположительно связанных с БА, можно посмотреть на сайте http://www.alzforum.org/res/com/gen/alzgene/default.asp

Около 6% всех случаев заболевания БА характеризуются ранним проявлением симптомов – в возрасте от 40 до 60 лет – 13% таких случаев являются генетически наследуемыми по аутосомно-доминантному типу, т.е. наследственной формой болезни Альцгеймера (НБА). НБА связана с мутациями в трех генах: *APP*, *PSEN1* и *PSEN2* (Bekris et al., 2010; Scheuner et al., 1996).

Тот факт, что у людей с синдромом Дауна, достигших возраста около 40 лет, присутствуют амилоидные образования в мозге, позволило связать ген *APP*, локализованный на 21 хромосоме, с БА (Giaccone et al., 1989). Ген *APP* кодирует белок-предшественник амилоида (Thinakaran, Koo, 2008). Существует несколько изоформ белка APP, образующихся за счет альтернативного сплайсинга, которые отличаются друг от друга по длине аминокислотной последовательности и по распределению в тканях организма. В центральной нервной системе преимущественно экспрессируется APP695; изоформы APP751 и APP770 экспрессируются и в центральной, и в периферической нервных системах. Изоформа APP770, которая в результате ферментативного разрезания превращается в Аβ, экспрессируется не только в нейронах, но и в клетках других тканей (Golde et al., 1990; Yoshikai et al., 1990).

Мутации в гене *APP* составляют 15% случаев НБА с ранним проявлением симптомов в возрасте от 40 до 50 лет (Janssen et al., 2003; Raux et al., 2005). Было идентифицировано более 32 мутаций в гене белка предшественника амилоида, связанных с НБА и локализованных преимущественно в сайте ферментативного разрезания секретазами. Наиболее изученными являются мутации APP_{swe} (обозначаемая в литературе также как «Swedish», *APP*SW, *APPKM670/671NL)* и APP_{lon} (обозначаемая «London», *APP*LON, *APP*717I), приводящие к усиленной продукции Аβ42 (Bekris et al., 2010). Расщепление белка APP α-секретазой (изоформы ADAM-9, ADAM-10, ADAM-17) приводит к образованию С-терминального фрагмента С83, альтернативное разрезание β-секретазой (изоформы BACE1, BACE2) приводит к образованию фрагмента С99. Процессинг С83- и С99-фрагментов завершает γ-секретаза с образованием фрагментов p3 и Аβ соответственно. В зависимости от точки разрезания γ-секретазой фрагмента С99 образуется либо 40 аминокислотный (Аβ40), либо 42 аминокислотный (Аβ42) экстраклеточный фрагмент Аβ (Thinakaran et al., 2008). В случае БА равновесие между данными формами смещено в сторону Аβ42, более склонного к олигомеризации и формированию бляшек. Многие мутации в гене *APP* или фармакологическое ингибирование α-секретазы приводят к преобладанию β-секретазного пути процессинга над α-секретазным путем процессинга APP и повышенному образованию Аβ (Nunan, Smal, 2000). Активность α-секретазы находится под контролем протеинкиназы С (PKC) и зависит от концентрации кальция в цитоплазме (Nelson et al., 2009). Наиболее токсичными считаются растворимые олигомеры Аβ, состоящие из 2–12 пептидов (Demuro et al., 2010; Lacor et al., 2007). Нерастворимая форма амилоидных образований рассматривается некоторыми исследователями как способ утилизации и инактивации токсичных растворимых форм Аβ (Demuro et al., 2010; Berridge, 2010).

Белки пресенилины известны как основные компоненты протеазного комплекса γ-секретазы – аспартиловой протеазы, осуществляющей разрезание белка APP (Thinakaran et al., 2008). Мутации в гене белка пресенилин-1 (*PSEN1*) относятся к

40% случаев аутосомно-доминантного наследования БА с ранним началом проявления симптомов в возрасте от 40 лет, и только 1% случаев приходится на мутации в гене белка пресенилин-2 (*PSEN2*). Более 176 разных мутаций, связанных с НБА, известны в гене белка пресенилин-1 и 14 мутаций в гене белка пресенилин-2. Дефекты в гене белка пресенилин-1 приводят к быстрой прогрессии заболевания, сопровождающейся паркинсонизмом (Bekris et al., 2010; Wolfe, 2007).

Ген *PSEN1* локализован на 14-й хромосоме и кодирует трансмембранный белок пресенилин-1 (PS1), состоящий из 467 аминокислот. Его гомолог *PSEN2* локализован на 1-й хромосоме и кодирует белок пресенилин-2 (PS2), состоящий из 448 аминокислот. Белки PS1 и PS2 экспрессируются преимущественно в тканях головного мозга. Они имеют массу около 50 кДа, состоят из 9 трансмембранных доменов и локализованы в мембранах аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума (ЭР) (Bekris et al., 2010). Было показано, что PS1 и PS2 способны формировать ионные каналы с низкой проводимостью. Эти каналы опосредуют выход кальция из просвета ЭР в цитоплазму за счет градиента концентрации кальция (Nelson et al., 2007; Tu et al., 2006). Кроме того, пресенилины подвергаются эндопротеолизу с образованием С-концевого (CTF) и N-концевого (NTF) фрагментов массой 18 кДа и 28 кДа для PS1 и 23 кДа и 35 кДа для PS2 соответственно. Разрезание происходит внутри гидрофильной петли между 6 и 7 трансмембранными доменами (HL), что, по всей видимости, изменяет конформацию фермента и переводит его в активное состояние. Ключевым моментом в активации эндопротеолиза является связывание белка PS1 с белком PSENEN (presenilin enhancer 2). Мутантный белок PS1 с делецией 9 экзона (PS1 DE9), кодирующего участок HL, демонстрирует ферментативную активность в отсутствие PSENEN и эндопротеолиза (Ahn et al., 2010). В комплексе с белками никастрин (Nct), Aph-1 (anterior pharynx defective 1) и PSENEN оба фрагмента пресенилинов входят в состав γ-секретазного комплекса (De Strooper, 2003; Sato et al., 2007). Этот комплекс осуществляет ферментативное разрезание многих трансмембранных белков, в том числе APP, Notch, белков E- и N-кадгеринов, a- и b-катенинов, нейрегулина внутри их трансмембранного домена (Georgakopoulos et al., 1999; Marambaud et al., 2003; Wiley et al., 2005; Dejaegere et al., 2008).

Мыши с нокаутом гена белка PS1 нежизнеспособны (*PSEN1*$^{-/-}$). Мыши с условным двойным нокаутом гена в переднем мозге в постнатальном периоде жизнеспособны, но демонстрируют нарушения когнитивных способностей – запоминания и ориентации в пространстве (Shen et al., 1997; Yu et al., 2001). В нейронах таких мышей были обнаружены нарушения процесса выброса нейромедиаторов, долгосрочной потенциации, и сниженная экспрессия белков, находящихся под контролем транскрипционного фактора CREB (Saura et al., 2004; Watanabe et al., 2009; Zhang et al., 2009a, 2010). Было показано, что данные нарушения кальций-зависимы (Zhang et al., 2010). Мыши *PSEN2*$^{-/-}$ практически не отличаются от мышей дикого типа. По всей видимости, белок PS1 более важен для нормального развития и функционирования нервной системы, чем белок PS2, что может объяснять преобладающее количество мутаций в гене белка PS1, связанных с БА (Elder et al., 2010). Мутации в генах *PSEN1* и *PSEN2* приводят к увеличению продукции Aβ42 и изменению соотношения Aβ42:Aβ40 в пользу Aβ42 (Bentahir et al., 2006; Page et al., 2007; Kuperstein et al., 2010).

Каким образом реализуется данный процесс, точно неизвестно. Существовало предположение, что мутации приводят к усилению функции γ-секретазы. Однако ряд исследований показал, что мутации приводят скорее к гипофункции γ-секретазы (Wolfe, 2007). С помощью компьютерного анализа было установлено, что около 75% мутаций в гене *PSEN1* локализуются в наиболее консервативных участках и, вероятнее всего, приводят к потере функции γ-секретазы (Kim, Kim, 2008). При этом в трансгенных мышиных моделях БА с одновременной вставкой мутантных генов *APP* и *PSEN1* происходит многократное увеличение числа амилоидных образований по сравнению с трансгенной моделью, экспрессирующей только мутантный APP (Kohler et al., 2005; Flood et al., 2002). Комбинация мутантной аллели *PSEN1* с *PSEN1*$^{-/-}$ вызывает увеличение количества Aβ42, но комбинация аллели *PSEN1* дикого типа с той же мутантной аллелью не приводит к такому эффекту (Wang et al., 2006). Следовательно, общее увеличение активности γ-секретазы не является причиной увеличения количества Aβ42. Некоторые исследователи считают, что гипофункция γ-секретазы приводит к недорезанию фрагмента APP с образованием более длинных форм Aβ (De Strooper, 2007; Wolfe, 2007).

Другим объяснением влияния мутаций в гене *PSEN1* на образование Aβ является преобладание пути разрезания белка APP β-секретазой BACE1 за счет уменьшения роли α-секретазы и/или повышения роли секретазы BACE1. Увеличение экспрессии и активности секретазы BACE1 было обнаружено в мышиных фибробластах экспрессирующих белки с мутациями PS1 M146V, S170F и L392V (Giliberto et al., 2008). Данные изменения могут быть связаны с влиянием белков PS1 и PS2 на кальциевый гомеостаз, так как экспрессия секретазы BACE1 находится под контролем транскрипционного фактора NFκB или CREB (Nunan, Smal, 2000; Buggia-Prevot et al., 2008), а активность α-секретазы находится под контролем PKC (Hung et al., 1993; Sinha, Lieberburg, 1999), регулируемых, в свою очередь, концентрацией внутриклеточного кальция.

3. Трансгенные мыши как модель наследственной болезни Альцгеймера

С того момента как было обнаружено, что мутации в генах *APP* и *PSEN1* являются причиной БА, не прекращались попытки создания трансгенных моделей данного заболевания.

Увеличение экспрессии мышиного APP никогда не приводило к образованию амилоидных бляшек и развитию патологий в мозге трансгенных мышей (Dewachter et al., 2000; Kohler et al., 2005). Это объясняется различной аминокислотной последовательностью человеческого и мышиного APP, отличающейся на 17 аминокислот, 3 из которых локализованы в последовательности Aβ. Для развития патологии у мышей необходима экспрессия мутантного человеческого APP (hAPP) (Crews et al., 2010). В различных моделях экспрессия мутантного hAPP приводила к образованию амилоидных бляшек, потере синапсов и смерти нейронов и как следствие – нарушению когнитивных способностей. Однако все эти эффекты имели слабовы-

раженный характер. Это обстоятельство привело к выводу, что данная модель не может отражать полный фенотип патологии БА, но может быть использована для изучения патологического влияния Аβ на нейроны (Duyckaerts et al., 2008).

Мыши с экспрессией мутантных PS1 под контролем специфичного для нейронов промотора Thy-1 имели признаки нейродегенеративных процессов в мозге – потерю синапсов и гибель нейронов в области гиппокампа и неокортекса (Scheuner et al., 1996; Auffret et al., 2009). Увеличение уровня экспрессии PS1 не могло послужить причиной данных изменений, т.к. они не были обнаружены у трансгенных мышей со вставкой дополнительного гена PS1 (Elder et al., 2010). В мозге мышей с экспрессией мутантных PS1 не было выявлено образования амилоидных бляшек, тем не менее, уровень Аβ42 был значительно повышен по сравнению с Аβ40. В случае мутаций PS1 I213T, A246E и PS1 ΔE9 было показано образование гиперфосфориллированного белка тау (Lazarov et al., 2006; Tanemura et al., 2006). В мозге трансгенных мышей с мутациями PS1 L286V, M146V, M146L и A246E был обнаружен ряд патологических изменений, включающих потерю синапсов и массовую гибель нейронов в гиппокампе и неокортексе, усиливающихся с возрастом (Rutten et al., 2005; Priller et al., 2007; Auffer et al., 2009; Elder et al., 2010).

С целью дополнить фенотип модели на основе трансгенных лабораторных животных при создании линий дважды трансгенных мышей APP/PS1 ряд мутаций в гене белка PS1 был скомбинирован с мутантным геном APP_{swe} (*APPKM670/671NL*). В мозге APP/PS1-мышей была отмечена потеря нейронов в области гиппокампа и неокортекса, соответствующая фенотипу БА. У таких мышей были обнаружены гистологические признаки БА, включающие образование амилоидных бляшек и наличие гиперфосфорилированного белка тау. При этом у дважды трансгенных мышей APP/PS1 уровень амилоидных образований был значительно повышен по сравнению с трансгенными мышами со вставкой одного гена $APP_{swe.}$ Для дважды трансгенных мышей также были показаны изменения в поведении, связанные с запоминанием и обучением (Duyckaerts et al., 2008; Elder et al., 2010).

У трансгенных моделей животных со вставкой мутантных APP и PS1 раздельно или вместе, тем не менее, не было показано образование нейрофибриллярных узелков из гиперфосфорилированного тау. Мутации в гене белка тау связаны с наследуемой формой лобно-височной деменции, характеризующейся образованием нейрофибриллярных узелков и массовой гибелью нейронов в лобных и височных долях головного мозга (Terwel et al., 2005). Мутант тау P301L был использован для создания трижды трансгенных мышей 3XTG в качестве модели БА. Мыши 3XTG со вставкой генов APPKM670/671NL, PS1 M146V и тау P301L демонстрируют более полный фенотип БА. Также как у пациентов с БА, в мозге 3XTG-мышей происходит образование амилоидных бляшек и нейрофибриллярных узелков, сопровождающееся гибелью нейронов гиппокампа и неокортекса (Duyckaerts et al., 2008). В гиппокампе 3XTG-мышей было показано понижение уровня синаптической передачи и долгосрочной потенциации, развивающееся к шести месяцам жизни. В нейронах гиппокампа этих мышей было обнаружено нарушение кальциевого гомеостаза: повышение содержания кальция в просвете ЭР, повышение уровня экспрессии RyR и подавление депо-управляемого входа кальция (Zhang et al., 2009b). У 3XTG-мышей

были обнаружены нарушения памяти и обучения, развивающиеся с возрастом. Поведение этих мышей в возрасте 6 месяцев отличается от поведения контрольных животных. При выполнении различных заданий 3XTG-мыши демонстрируют высокий уровень беспокойства, повышение уровня реакций замирания, снижение показателей исследовательского поведения, понижение сенсомоторных реакций, локомоторной активности и снижение способности повторного узнавания объекта (Oddo et al., 2003). Эти изменения соответствуют нарушению работы гиппокампа и миндалевидного тела, а также соотносятся с нейропсихиатрическими симптомами БА у человека (Sterniczuk et al., 2010a,b). Таким образом, на данный момент наиболее удачной моделью БА являются трансгенные мыши 3XTG, демонстрирующие наибольшее совпадение с фенотипом данного заболевания.

4. Роль амилоида-β в болезни Альцгеймера

Причина БА не известна. Однако является общепринятым, что центральную роль в патологии как спорадической, так и наследственной БА играет Aβ, олигомеры которого образуют бляшки в тканях головного мозга. Данная гипотеза носит название «амилоидной гипотезы», а события, происходящие в результате патологического воздействия Aβ на нейроны, называются «амилоидным каскадом» (Demuro et al., 2010). Существует общее мнение, что мишенью для амилоидных олигомеров являются синапсы, в частности постсинаптические окончания. Наиболее вероятными претендентами на роль рецептора к амилоиду являются: прионный белок, α-7-никотиновый рецептор, метаботропный глутаматный рецептор (mGluR) и NMDA-рецептор (Wang et al., 2000; Demuro et al., 2010; Ferreira et al., 2012). В соответствии с амилоидной гипотезой образование агрегатов Aβ предшествует образованию нейрофибриллярных узелков из гиперфосфорилированного белка тау, который в свою очередь опосредует токсическое влияние Aβ на нейроны (Ittner et al., 2010; Ittner, Gotz, 2011). В норме белок тау ассоциирован с микротрубочками и участвует в процессе аксонального транспорта в нейронах. Способность белка тау связываться с микротрубочками регулируется за счет фосфорилирования (Duyckaerts et al., 2009). При БА происходит увеличение сайтов фосфорилирования белка тау, сайты Thr231 и Ser262 считаются специфичными для БА (Alonso et al., 2010). Причины появления гиперфосфорилированной формы белка тау, не характерной для дифференцированных нейронов в норме, до конца не ясны. Предположительно, гиперфосфорилирование белка тау осуществляется киназой GSK-3β. Взаимосвязь между активностью данной киназы и образованием нейрофибриллярных узелков была показана в нейронах мышиных трансгенных моделей НБА (Caccamo et al., 2007). Вторичность возникновения нейрофибриллярных узелков и тау-опосредуемая реализация цитотоксичности были подтверждены в исследованиях, в которых использование иммунизации против Aβ снижало уровень образования нейрофибриллярных узелков, а также в исследованиях с использованием тау$^{-/-}$ мышей, демонстрировавших снижение токсического влияния Aβ на нейроны в условиях отсутствия экспрессии гена белка tau. Возможно, что воздействие гиперфосфорилированного

белка tau на чувствительность NMDAR к Аβ опосредовано киназой FYN (Ittner et al., 2010; Ittner, Gotz, 2011). Таким образом, взаимное влияние белка тау и Аβ можно описать как своеобразное цитотоксическое «pasdedeux» (Ittner, Gotz, 2011).

Один из результатов негативного действия Аβ на нейроны – это нарушение кальциевого гомеостаза. Известно, что аппликация Аβ к культуре нейронов приводит к повышению уровня концентрации кальция в цитоплазме (Mattson et al., 1992). Было показано, что Аβ может оказывать влияние на активность потенциал-управляемых кальциевых каналов (N-, P- и Q-типов) на никотиновый ацетилхолиновый рецептор (α_7-nAChR), ионотропные глутаматные рецепторы AMPA и NMDA, допаминовые и серотониновые рецепторы. Существуют доказательства связи между Аβ и холинэргической и глутаматэргической нейромедиаторными системами в патологии БА. Такие рецепторы, как α_7-nAChR, AMPA, NMDA, проводят кальций из внеклеточной среды и экспрессируются в большом количестве в коре больших полушарий и гиппокампе, где при БА происходит массовая потеря нейронов (Demuro et al., 2010). Также было показано, что Аβ способен формировать неселективные ионные каналы в плазматической мембране, обогащенной фосфатидилсерином, нарушая тем самым обмен ионов между клеткой и внеклеточной средой. Повышенный уровень фосфатидилсерина характерен для клеток с пониженным уровнем обеспечения клеток энергией митохондриями. Таким образом, Аβ может принимать участие в гибели нейронов в результате нарушения работы митохондрий (Demuro et al., 2010; Supnet, Bezprozvanny, 2010).

5. Кальциевая гипотеза болезни Альцгеймера

Нарушение кальциевого гомеостаза рассматривается как причина патологии БА в так называемой «кальциевой гипотезе». Для кальциевой гипотезы нехарактерно отрицание роли Аβ или белка тау в прогрессии заболевания. Существенным отличием кальциевой гипотезы является предположение о том, что нарушение кальциевого гомеостаза предшествует появлению амилоидных бляшек, нейрофибриллярных узелков и массовой гибели нейронов. Согласно данной гипотезе, в результате первичного нарушения кальциевого гомеостаза происходит образование амилоидных бляшек, которые в свою очередь оказывают влияние на кальциевые каналы, рецепторы и другие сигнальные молекулы, действуя по принципу положительной обратной связи (Berridge, 2010; Demuro et al., 2010; Mattson, 2010; Supnet, Bezprozvanny, 2010).

Подтверждением этой гипотезы служат данные о том, что деполяризация мембраны и активация кальциевых каналов L-типа, аппликация к культуре нейронов кальциевых ионофоров или повышение внутриклеточной концентрации кальция в таких условиях, как ишемия, приводят к увеличению продукции Аβ42 (Pierrot et al., 2004; Berridge, 2010). Более того, в исследованиях, проведенных на фибробластах людей с НБА и мышиных трансгенных моделях БА, было показано, что нарушение кальциевого гомеостаза предшествует проявлению симптомов и гистологических маркеров БА (Ito et al., 1994; Gibson et al., 1996). Существует также связь между

нарушением кальциевого гомеостаза и появлением нейрофибриллярных узелков, образованных цитоскелетным белком tau. Было показано, что нейроны с высоким уровнем экспрессии кальций-зависимой протеазы кальпаин и кальмодулин-зависимой киназы II с наибольшей вероятностью образуют нейрофибриллярные узелки на ранних стадиях развития заболевания в мозге больных БА (McKee et al., 1990). Чрезмерная активация глутаматных рецепторов в нейронах гиппокампа приводит к изменениям в работе тау и микротрубочек и образованию структур, подобных нейрофибриллярным узелкам (Mattson, 1990). Также на первичной культуре кортикальных нейронов было напрямую показано кальций-зависимое фосфорилирование и дефосфорилирование белка тау, опосредованное киназой GSK-3β и фосфатазой кальцинейрин (Pierrot et al., 2006).

Уникальность иона кальция заключается в его участии в большом количестве клеточных процессов: возбудимости мембраны, выбросе нейромедиаторов, росте аксона, активности митохондрий, внутриклеточной передаче сигналов и экспрессии генов, клеточной дифференцировке и апоптозе. Кальций является универсальным вторичным посредником и участвует в передаче сигналов, регулируя активность многих ферментов, таких как кальмодулин-зависимые киназы, протеинкиназа С, NO-синтаза, протеаза кальпаин, фосфотаза кальцинейрин, а также транскрипционных факторов NFκB, NFAT и CREB (Bito et al., 2003; Toescu, Verkhratsky, 2007; Amici et al., 2009).

В регуляцию концентрации Ca^{2+} в нейронах вовлекается большое количество Ca^{2+}-каналов: потенциал-управляемые Ca^{2+}-каналы плазматической мембраны (VGCC), NMDA рецепторы, AMPA-рецепторы, кальциевый канал CALHM1 и депо-управляемые кальциевые каналы. Высвобождение Ca^{2+} из ЭР осуществляется рецепторами инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP_3R) и рианодиновыми рецепторами (RyR) (LaFerla, 2002; Thibault et al., 2007; Emptage et al., 2010; Gallego-Sandin et al., 2011). Помпа SERCA в ЭР, Ca^{2+}-помпа плазматической мембраны и Na^+/Ca^{2+}-обменник плазматической мембраны контролируют концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме в узком диапазоне значений. В формировании цитоплазматических Ca^{2+}-сигналов важную роль играют митохондрии. Митохондриальный Ca^{2+}-переносчик (MCU) является ионным каналом, который вовлекается в мощный и быстрый вход кальция в митохондрии (LaFerla, 2002) (рис. 1).

Внутриклеточная концентрация кальция в нейронах регулируется, в том числе за счет кальциевых буферов, основу которых представляют кальций-связывающие белки. К таким белкам относятся кальбандин, парвальбумин и кальретинин, широко экспрессирующиеся в центральной нервной системе. Отделы головного мозга, нейроны внутри одного отдела мозга и нейроны различных нейромедиаторных систем отличаются по преобладающей форме, уровню экспрессии кальций-связывающего буферного белка и, соответственно, по буферной емкости. Таким образом, нейроны отличаются по чувствительности к изменению концентрации кальция (Toescu, Verkhratsky, 2007).

Такое многообразие Ca^{2+}-зависимых элементов обеспечивает возможность тонкой Ca^{2+}-зависимой регуляции нейрональных функций во временной шкале, варьирующей от микросекунд (как в случае с Ca^{2+}-зависимым слиянием синаптичес-

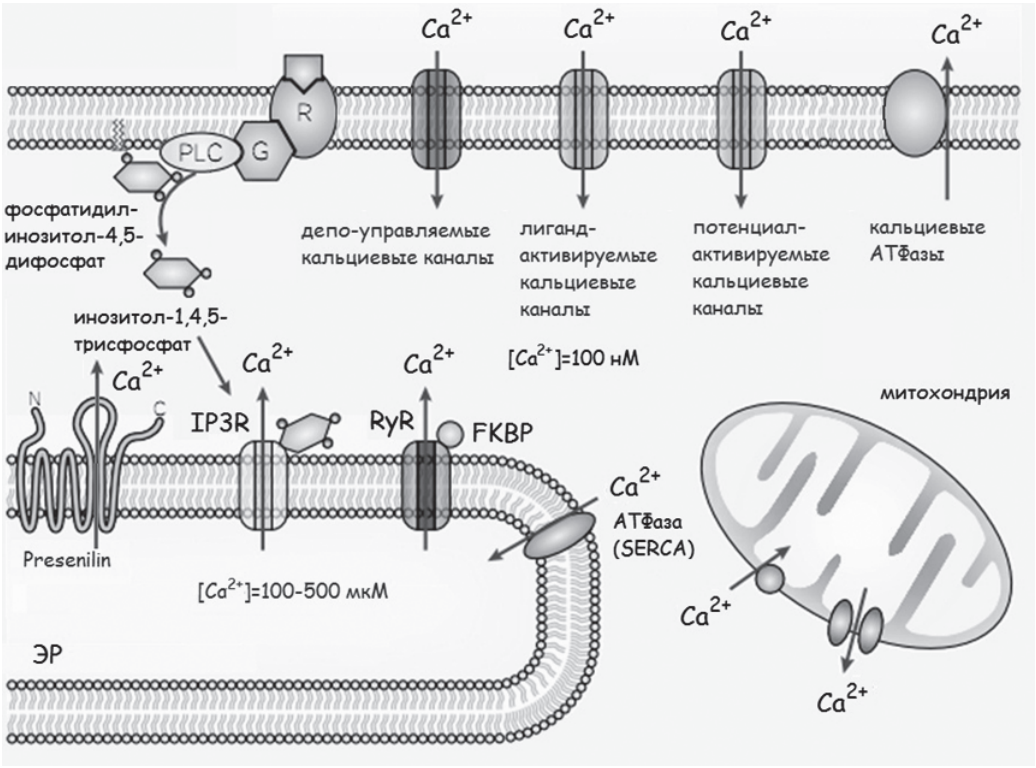


Рис. 1. Регуляция концентрации кальция в нейронах. Цитируется по (La Ferla, 2002) с изменениями. Объяснение в тексте

кого пузырька с пресинаптической мембраной) до секунд и минут (как в случае с Ca^{2+}-зависимым фосфорилированием и дефосфорилированием) и до дней и даже лет (как в случае с Ca^{2+}-зависимыми изменениями в нейрональной экспрессии генов). Эти Ca^{2+}-зависимые процессы ведут к кратковременным и долговременным изменениям возбудимости нейронов (посредством изменения активности ионных каналов и характера их экспрессии) и к изменениям синаптической передачи (посредством модификации синаптической «машинерии» и облегчения формирования или разобщения синаптических связей) (Harney et al., 2006).

Процесс запоминания связан с активацией долгосрочной потенциации и увеличением пластичности глутаматергических синапсов в гиппокампе. Долгосрочная потенциация запускается за счет достижения критической концентрации Ca^{2+} в нейронах при активации глутаматных рецепторов AMPAR, NMDAR и mGluR в ответ на выброс глутамата из пресинаптических окончаний. Поддержание долгосрочной потенциации происходит за счет Ca^{2+} в качестве вторичного посредника (Harney et al., 2006). Процесс стирания памяти связан с активацией долгосрочной депрессии, которая происходит при меньших концентрациях Ca^{2+} в цитоплазме. Основная роль в регуляции долгосрочной депрессии в гиппокампе отводится **mGluR и кальций-зависимой фосфатазе кальцинейрин**. Кальцинейрин может активировать эндоцитоз

AMPAR и NMDAR, уменьшая, таким образом, силу синаптической связи между нейронами (Foster, 2007; Toescu, Verkhratsky, 2007).

Риск развития БА увеличивается с возрастом. Для объяснения временных изменений в мозге, способствующих развитию заболевания, была предложена интегральная модель зависимых от возраста изменений в обороте гиппокампального Ca^{2+} (Gant et al., 2006). Сравнительные исследования нейронов молодых и старых грызунов показали, что основные элементы Ca^{2+}-сигнализации в нейронах подвергаются значительным возрастным изменениям (Toescu, Verkhratsky, 2007) В стареющих нейронах было обнаружено увеличение концентрации Ca^{2+} через усиление высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо через IP_3R и RyR, усиление входа Ca^{2+} через потенциал-активируемые кальциевые каналы L-типа, увеличение медленной следовой гиперполяризации вследствие активации Ca^{2+}-зависимых K^+-каналов, уменьшение вклада NMDAR-опосредованного входа Ca^{2+}, уменьшение цитоплазматической буферной емкости. Такие изменения приводят к усилению восприимчивости к индукции долгосрочной депрессии и к увеличению пороговой частоты для запуска долгосрочной потенциации в стареющих нейронах (Foster, 2007). Таким образом, возрастные изменения могут способствовать усилению тех патологических изменений в кальциевой сигнализации, которые предшествуют развитию симптомов БА.

6. Мутации в гене белка пресенилин-1 приводят к нарушению гомеостаза кальция

Известно более 176 мутаций в гене белка пресенилин-1 (PS1), связанных с НБА, на долю этих мутаций приходится около 40% случаев НБА. Первоначально связь между PS1 и Ca^{2+}-сигнализацией была установлена, когда появилось сообщение об аномально большом выбросе кальция из ЭР в ответ на действие IP_3 в фибробластах пациентов с НБА (Ito et al., 1994; Etcheberrigaray et al., 1998). Сходные данные были получены в экспериментах на ооцитах *Xenopus laevis* (Leissring et al., 1999), на фибробластах и кортикальных нейронах мышей, экспрессирующих мутантные формы PS1, характерные для НБА (Leissring et al., 2000; Stutzmann et al., 2004, 2006). Кальций-индуцируемый кальциевый ответ через RyR также был увеличен в клетках линии PC12, линии SH-SY5 и кортикальных нейронах мышей, экспрессирующих мутантные формы PS1, характерные для НБА (Chan et al., 2000; Stutzmann et al., 2006; Rybalchenko et al., 2008). Изучение влияния мутаций в PS1 на биофизические свойства каналов RyR и IP_3R (Cheung et al., 2008; Rybalchenko et al., 2008) показали увеличение вероятности их открытого состояния и, как следствие, увеличение индуцированного выхода кальция из ЭР. По всей видимости, к такому эффекту приводит повышенная концентрация кальция в ЭР, показанная в нейронах и фибробластах мышей, экспрессирующих мутантные формы PS1. Изменение концентрации кальция в ЭР рассматривается как основная причина нарушения депоуправляемого входа кальция, связанного с мутациями в гене белка PS1 (Tu et al., 2006; Nelson et al., 2007).

Увеличение выброса кальция из ЭР за счет RyR или IP_3R и нарушение депо-управляемого входа кальция могут оказывать действие на индуцированный выброс глутамата в синаптическую щель и, как следствие, на синаптическую пластичность (Chakroborty et al., 2009). Нарушение синаптической передачи было обнаружено в переживающих срезах гиппокампа трансгенных мышей с экспрессией мутантных форм PS1. В гиппокампе мышей с мутацией PS1 M146V нарушена холинэргическая модуляция долгосрочной потенциации. По сравнению с мышами дикого типа у трансгенных мышей в нейронах гиппокампа были отмечены ингибирование долгосрочной потенциации в ответ на активацию мускаринового ацетилхолинового рецептора и пониженная активность NMDAR (Wang et al., 2000). В культуре кортикальных нейронов мышей PS1 L286V и PS1 A246E была обнаружена повышенная чувствительность к токсическому действию глутамата, индуцирующему гибель нейронов. Предположительно, токсическое действие глутамата связано с большим выбросом Ca^{2+} из ЭР в ответ на активацию RyR и IP_3R. Гипотеза о Ca^{2+}-зависимой токсичности глутамата подтверждается тем, что использование специфических блокаторов RyR и кальциевых каналов L-типа предотвращает его токсическое действие на нейроны с мутантными PS1 (Scheuner et al., 1996; Guo et al., 1999; Schneider et al., 2001).

Увеличение концентрации кальция в ЭР в результате мутаций в белке PS1 является наиболее вероятной причиной описанных выше нарушений. По всей видимости, к такому результату приводит потеря функции канала белком PS1, опосредующим конститутивный выход кальция из ЭР в цитоплазму за счет градиента концентрации (Zhang et al., 2009b).

7. Белок пресенилин-1 работает как канал «утечки» кальция из эндоплазматического ретикулума

В экспериментах с использованием бислойных липидных мембран (БЛМ) было показано, что белок PS1 способен формировать ионные каналы низкой проводимости, опосредующие транспорт ионов Ba^{2+}. При исследовании влияния мутаций, характерных для НБА, на функцию канала белка PS1 было показано, что мутации PS1 M146V, L166P, E273A, G384A, P436Q приводят к потере функции канала белком PS1, мутация PS1 ΔE9 оказывает обратный эффект и усиливает транспорт ионов через канал, а мутации PS1 D257A, L113P, G183V и PS1-Rins352 не оказывают влияния на ток ионов через данный канал (Tu et al., 2006; Nelson et al., 2007). По аналогии с другими известными ионными каналами, функциональные каналы PS1, вероятно, являются мультимерами нескольких субъединиц PS1. Мутантный белок PS1 M146V оказывает негативное влияние на способность канала PS1 проводить ионы Ba^{2+} через БЛМ, образуя, по всей видимости, нефункциональный мультимер PS1:PS1 M146V (Tu et al., 2006) (рис. 2).

Генетическое удаление PS1 приводит к многократному повышению концентрации кальция в ЭР фибробластов мышей, а также к уменьшению в 5,6 раз скорости пассивной утечки Ca^{2+}, свидетельствуя о том, что пресенилины ответственны при-



Рис. 2. PS1 формируют низкопроводящие катионные каналы в бислойных липидных мембранах. Цитируется по (Tu et al., 2006) с изменениями

Показаны токи Ba^{2+} регистрируемые в экспериментах на БЛМ для пустых мембран (БЛМ), для микросом из неинфицированных клеток Sf9 (Sf9) и для микросом из клеток Sf9, инфицированных бакуловирусами с белками PS1 дикого типа и мутантными PS1

мерно за 80% общей эндогенной активности пассивной утечки Ca^{2+} из ЭР (Tu et al., 2006; Nelson et al., 2007). Аналогичные результаты были получены на нейронах гиппокампа мышей с двойным нокаутом PS1 (DKO) и на нейронах гиппокампа мышиной модели БА со вставкой гена PS1 M146V (Zhang et al., 2009b). При экспрессии в фибробластах и нейронах гиппокампа DKO мышей мутантов PS1 ΔE9 и PS1 D257A или PS1 дикого типа происходило восстановление нормальной концентрации кальция в просвете ЭР, чего не наблюдалось при экспрессии мутантов PS1 M146V, L166P, A246E, E273A, G384A и P436Q (Tu et al., 2006; Nelson et al., 2007). Увеличение концентрации Ca^{2+} в просвете ЭР и уменьшение скорости утечки Ca^{2+} из ЭР были обнаружены в фибробластах пациентов с мутацией PS1 A246E (Nelson et al., 2007).

Функция PS1 в качестве канала в ЭР не зависит от активности γ-секретазы, т.к. мутант PS1 D257A, вызывающий потерю активности γ-секретазы вследствие замены функционального аспартата (Berezovska et al., 2000), не нарушает работу канала PS1 и восстанавливает концентрацию кальция до нормального уровня в нейронах и фибробластах мышей с двойным нокаутом гена PS1. Интересно, что мутанты PS1 L113P, G183V и PS1-Rins352 не связаны с БА, а были идентифицированы как мутации, приводящие к другому нейродегенеративному заболеванию – лобно-височной деменции, характеризующейся потерей нейронов в области лобных и височных долей коры головного мозга (Hutton, 2004).

Тем не менее, ряд других групп не подтверждают участия белка PS1 в проведении утечки кальция из ЭР в цитоплазму (Shilling et al., 2012; Wu et al., 2013). Исследования на тех же трансгенных мышах линии 3XTG и фибробластах с двойным нокаутом гена PS1 не показали изменения в утечке кальция из ЭР (Shilling et al., 2012). Другая группа в то же время подтвердила роль белка PS2 в регуляции утечки кальция из ЭР (Bandara et al., 2013). Наша группа также обнаружила другой механизм влияния мутаций в гене PS1 на содержание кальция в депо (Ryazantseva et al., 2013). Полученные данные свидетельствуют о том, что нарушения депонирования кальция связаны с гиперактивностью кальциевых сенсоров ЭР STIM, регулирующих активность депо-управляемых кальциевых каналов и концентрацию кальция в депо и цитоплазме. Таким образом, гипотеза о роли PS1 в качестве каналов утечки кальция на данный момент остается противоречивой.

8. Изменения активности депо-управляемых и потенциал-управляемых кальциевых каналов, связанные с мутациями в гене белка PS1

Кальциевые сенсоры STIM1 и STIM2 находятся в мембране ЭР и реагируют на изменения концентрации кальция в его просвете. При понижении концентрации кальция в ЭР сенсоры STIM активируют депо-управляемые кальциевые каналы. Для сенсора STIM1 было также показано, что он ингибирует активность потенциал-управляемых кальциевых каналов T-типа и L-типа (Harraz, Alter, 2014). За счет различий в строении сенсоры STIM1 и STIM2 также отличаются по чувствительности к изменениям концентрации кальция. STIM2 чувствителен к небольшим изменениям в концентрации кальция и может активироваться даже в состоянии покоя клетки. STIM1, напротив, работает по механизму «все или ничего» и нуждается в сильном сигнале понижения концентрации кальция (Brandman et al., 2007). В рамках выполнения проекта по программе Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» нами было продемонстрировано, что мутации в гене PS1 приводят к гиперактивности сенсоров STIM (Ryazantseva et al., 2013). Гиперактивность сенсоров STIM приводит к нарушениям регуляции депо-управляемых и потенциал-управляемых кальциевых каналов (Ryazantseva et al., 2014). Подавление активности депо-управляемых каналов имело положительные эффект для устранения нарушений памяти в трансгенных моделях БА на основе *Drosophila melanogaster*, экспрессирующих мутантные человеческие PS1 (неопубликованные данные).

9. Заключение

Не менее ста лет исследований пролили свет на некоторые механизмы нейродегенерации, сопровождающие БА (Goedert, Spillantini, 2006). В процессе нейродегенерации при БА принимает участие множество молекул и сигнальных путей. Об этом свидетельствуют исследования генетики БА, связавшие более 10 различных генов с риском развития данного заболевания (Bekris et al., 2010). В настоящий момент очевидна роль амилоидного каскада в развитии указанной патологии (Demuro et al., 2010). Тем не менее, неизвестно, что именно в определенном возрасте приводит к накоплению амилоида, более склонного к формированию токсических олигомеров, нарушение какого процесса является ключевым для начала развития заболевания, т.к. большинство случаев болезни являются спорадическими. С этим связана и сложность моделирования БА на животных, подразумевающая генетическую модификацию сразу несколькими человеческими мутантными генами (Elder et al., 2010).

Кальциевая гипотеза БА предполагает, что изменения в кальциевом гомеостазе могут быть как начальным фактором для развития заболевания, так и сопровождать сам процесс нейродегенерации (Emptage et al., 2010; Mattson, 2010; Supnet, Bezprozvanny, 2010; Ballard et al., 2011). Однако в рамках этой гипотезы также остается много вопросов: какой кальций-зависимый сигнальный каскад напрямую влияет на

патологический процессинг Aβ?; какие кальциевые каналы вовлечены в этот процесс?; какие возрастные нарушения регуляции кальциевого гомеостаза в нейронах могут стать ключевыми факторами риска развития БА?; можно ли использовать нарушения кальциевого гомеостаза в клетках в качестве диагностического маркера БА для пожилых людей до развития симптомов?

На данный момент участие кальциевых сигнальных путей в патологии БА показано во многих исследованиях. Фармакологический препарат, модулирующий активность кальциевого канала NMDAR – мемантин – хорошо показал себя в клинических испытаниях и используется в практике лечения БА (Ballard et al., 2011). Таким образом, поиск новых мишеней и фармакологических агентов, затрагивающих регуляцию кальциевого гомеостаза, имеет большое значение для разработки новых подходов в терапии БА.

Литература

Ahn K., Shelton C.C., Tian Y., Zhang X. et al. Activation and intrinsic gamma-secretase activity of presenilin 1 // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2010. Vol. 107. № 50. P. 21435-21440.

Alonso A.D., Di Clerico J., Li B. et al. Phosphorylation of tau at Thr212, Thr231, and Ser262 combined causes neurodegeneration // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 40. P. 30851-30860.

Amici M., Doherty A., Jo J. et al. Neuronal calcium sensors and synaptic plasticity // Biochem. Soc. Trans. 2009. Vol. 37. P. 1359-1363.

Auffret A., Gautheron V., Repici M. et al. Age-dependent impairment of spine morphology and synaptic plasticity in hippocampal CA1 neurons of a presenilin 1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease // J. Neurosci. 2009. Vol. 29. P. 10144-10152.

Ballard C., Gauthier S., Corbett A. et al. Alzheimer's disease // Lancet. 2011. Vol. 377. P. 1019-1031.

Bandara S., Malmersjö S., Meyer T. Regulators of calcium homeostasis identified by inference of kinetic model parameters from live single cells perturbed by siRNA // Sci. Signal. 2013 V. 6 P. ra56.

Bekris L.M., Yu C.E., Bird T.D. et al. Genetics of Alzheimer disease // J. Geriatr. Psychiatry Neurol. 2010. Vol. 23. P. 213-227.

Bentahir M., Nyabi O., Verhamme J. et al. Presenilin clinical mutations can affect gamma-secretase activity by different mechanisms // J. Neurochem. 2006. Vol. 96. P. 732-742.

Berezovska O., Jack C., McLean P. et al. Aspartate mutations in presenilin and gamma-secretase inhibitors both impair notch1 proteolysis and nuclear translocation with relative preservation of notch1 signaling // J. Neurochem. 2000. Vol. 75. № 2. P. 583-593.

Berridge M.J. Calcium hypothesis of Alzheimer's disease // Pflugers Arch. 2010. Vol. 459. P. 441-449.

Bito H., Takemoto-Kimura S. Ca^{2+}/CREB/CBP-dependent gene regulation: a shared mechanis critical in long-term synaptic plasticity and neuronal survival // Cell Calcium. 2003. Vol. 34. P. 425-430.

Brandman O., Liou J., Park W..S et al. STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} levels // Cell. 2007. Vol. 131. P. 1327-1339.

Buggia-Prevot V., Sevalle, J., Rossner S. et al. NFkappaB-dependent control of BACE1 promoter transactivation by Abeta42 // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283. P. 10037-10047.

Caccamo A., Oddo S., Tran L.X. et al. Lithium reduces tau phosphorylation but not A beta or working memory deficits in a transgenic model with both plaques and tangles // Am. J. Pathol. 2007. Vol. 170. № 5. P. 1669-1675.

Chakroborty S., Goussakov I., Miller M.B. et al. Deviant ryanodine receptor-mediated calcium release resets synaptic homeostasis in presymptomatic 3xTg-AD mice // J. Neurosci. 2009. Vol. 29. № 30. P. 9458-9470.

Chan S.L., Mayne M., Holden C.P. et al. Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 18195-18200.

Cheung K.H., Shineman D., Müller M. et al. Mechanism of Ca^{2+} disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP3 receptor channel gating // Neuron. 2008. Vol. 58. P. 871-883.

Coon K.D., Myers A.J., Craig D.W. et al. A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease // J. Clin. Psychiatry. 2007. Vol. 68. № 4. P. 613-618.

Crews L., Rockenstein E., Masliah E. APP transgenic modeling of Alzheimer's disease: mechanisms of neurodegeneration and aberrant neurogenesis // Brain Struct. Funct. 2010. Vol. 214. P. 111-126.

De Strooper B. Aph-1, Pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active γ-secretase complex // Neuron. 2003. Vol. 38. P. 9-12.

De Strooper B. Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease // EMBO. 2007. Vol. 8. P. 141-146.

Dejaegere T., Serneels L., Schafer M.K. et al. Deficiency of Aph1B/C-g-secretase disturbs Nrg1 cleavage and sensorimotor gating that can be reversed with antipsychotic treatment // Proc. Natl. Acad. Sci. 2008. Vol. 105. P. 9775-9780.

Demuro A., Parker I., Stutzmann G.E. Calcium signaling and amyloid toxicity in Alzheimer disease // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285. P. 12463-12468.

Dewachter I., Van Dorpe J., Smeijers L. et al. Aging increased amyloid peptide and caused amyloid plaques in brain of old APP/V717I transgenic mice by a different mechanism than mutant presenilin1 // J. Neurosci. 2000. Vol. 20. P. 6452-6458.

Duyckaerts C., Delatour B., Potier M. Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences // Acta. Neuropathol. 2008. Vol. 115. P. 5-38.

Duyckaerts C., Delatour B., Potier M. Classification and basic pathology of Alzheimer disease // Acta. Neuropathol. 2009. Vol. 118. P. 5-36.

Elder G.A., Gama Sosa M.A., De Gasperi R. et al. Presenilin transgenic mice as models of Alzheimer's disease // Brain Struct. Funct. 2010. Vol. 214 P. 127-43.

Emptage N.J., Reid C.A., Fine A. Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca^{2+} entry, and spontaneous transmitter release // Neuron. 2010. Vol. 29. P. 197-208.

Etcheberrigaray R., Hirashima N., Nee L. et al. Calcium responses in fibroblasts from asymptomatic members of Alzheimer's disease families // Neurobiol. Dis. 1998. Vol. 5. P. 37-45.

Fan L.Y., Chiu M.J. Pharmacological treatment for Alzheimer's disease: current approaches and future strategies // Acta. Neurol. Taiwan. 2010. Vol. 19. P. 228-245.

Ferreira I.L., Bajouco L.M., Mota S.I. et al. Amyloid beta peptide 1-42 disturbs intracellular calcium homeostasis through activation of GluN2B-containing N-methyl-d-aspartate receptors in cortical cultures // Cell Calcium. 2012. Vol. 51. № 2. P. 95-106.

Flood D.G., Reaume A.G., Dorfman K.S. et al. FAD mutant PS-1 gene-targeted mice: increased Ab42 and Ab deposition without APP overproduction // Neurobiol. Aging. 2002. Vol. 23. P. 335-348.

Foster T.C. Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain // Aging Cell. 2007. Vol. 6. P. 319-325.

Gallego-Sandín S., Alonso M.T., García-Sancho J. Calcium homoeostasis modulator 1 (CALHM1) reduces the calcium content of the endoplasmic reticulum (ER) and triggers ER stress. // Biochem. J. 2011. Vol. 437. №.3. P. 469-475.

Gant J.C., Sama M.M., Landfield P.W. et al. Early and simultaneous emergence of multiple hippocampal biomarkers of aging is mediated by Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release // J. Neurosci. 2006. Vol. 26. P. 3482-3490.

Georgakopoulos A., Marambaud P., Efthimiopoulos S. et al. Presenilin-1 forms complexes with the cadherin/catenin cell-cell adhesion system and is recruited to intercellular and synaptic contacts // Mol. Cell. 1999. Vol. 4. P. 893-902.

Giaccone G., Tagliavini F., Linoli G. et al. Down patients: extracellular preamyloid deposits precede neuritic degeneration and senile plaques // Neurosci. Lett. 1989. Vol. 97. P. 232-238.

Gibson G.E., Zhang H., Toral-Barza L. et al. Calcium stores in cultured fibroblasts and their changes with Alzheimer's disease // Biochim. Biophys. Acta. 1996. Vol. 1316. № 2. P. 71-77.

Giliberto L., Borghi R., Piccini A. et al. Mutant Presenilin 1 Increases the Expression and Activity of BACE1 // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 284. № 14. P. 9027-9038.

Goedert M., Spillantini M.G. A century of Alzheimer's disease // Science. 2006. Vol. 314. P. 777-781.

Golde T.E., Estus S., Usiak M. et al. Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR // Neuron. 1990. Vol. 4. № 2. P. 253-267.

Guo Q., Fu W., Sopher B.L., Miller M.W. et al. Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice // Nat. Med. 1999. Vol. 5. P. 101-106.

Harney S.C., Rowan M., Anwyl R. Long-term depression of NMDA receptor-mediated synaptic transmission is dependent on activation of metabotropic glutamate receptors and is altered to long-term potentiation by low intracellular calcium buffering // J. Neurosci. 2006. Vol. 26. № 4. P. 1128-1132.

Harraz O.F., Altier C. STIM1-mediated bidirectional regulation of Ca(2+) entry through voltage-gated calcium channels (VGCC) and calcium-release activated channels (CRAC) // Front Cell Neurosci. 2014. Vol. 8. P. 43.

Hung A.Y., Haass C., Nitsch R.M. et al. Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid beta-protein // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 268. P. 22959-22962.

Hutton M. Presenilin mutations associated with fronto-temporal dementia // Ann. Neurol. 2004. Vol. 55. P. 604-606.

Ito E., Oka K., Etcheberrigaray R. et al. Internal Ca^{2+} mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91. P. 534-538.

Ittner L.M., Götz J. Amyloid-β and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease // Nat. Rev. Neurosci. 2011. Vol. 12. P. 65-72.

Ittner L.M., Ke Y.D., Delerue F. et al. Dendritic function of tau mediates amyloid-b toxicity in Alzheimer's desease mouse models // Cell. 2010. Vol. 142. № 3. P. 387-397.

Janssen J.C., Beck J.A., Campbell T.A. et al. Early onset familial Alzheimer's disease: mutation frequency in 31 families // Neurology. 2003. Vol. 60. № 2. P. 235-239.

Kim S.D., Kim J. Sequence analyses of presenilin mutations linked to familial Alzheimer's disease // Cell Stress Chaperones. 2008. Vol. 13. №. 4. P. 401-412.

Kohler C., Ebert U., Baumann K. et al. Alzheimer's disease-like neuropathology of gene-targeted APP-SLxPS1mut mice expressing the amyloid precursor protein at endogenous levels // Neurobiol. Dis. 2005. Vol. 20. P. 528-540.

Kuperstein I., Broersen K., Benilova I. et al. Neurotoxicity of Alzheimer's disease Ab peptides is induced by small changes in the Ab42 to Ab40 ratio // EMBO J. 2010. Vol. 29. P. 3408-3420.

Lacor P.N., Buniel M.C., Furlow P.W. et al. A beta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease // J. Neurosci. 2007. Vol. 27. P. 796-807.

La Ferla F.M. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in Alzheimer's disease // Nat. Rev. Neurosci. 2002. Vol. 3. P. 862-872.

Lazarov O., Peterson L.D., Peterson D.A. et al. Expression of a familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 variant enhances perforant pathway lesion-induced neuronal loss in the entorhinal cortex // J. Neurosci. 2006. Vol. 26. P. 429-434.

Leissring M.A., Paul B.A., Parker I. et al. Alzheimer's presenilin-1 mutation potentiates inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated calcium signaling in Xenopus oocytes // J. Neurochem. 1999. Vol. 72. P. 1061-1068.

Leissring M.A., Akbari Y., Fanger C.M. et al. Capacitative calcium entry deficits and elevated luminal calcium content in mutant presenilin-1 knockin mice // J. Cell Biol. 2000. Vol. 149. P. 793-798.

Marambaud P., Wen P.G., Dutt A. et al. A CBP binding transcriptional repressor produced by the PS1/1-cleavage of N-cadherin is inhibited by PS1 FAD mutations // Cell. 2003. Vol. 114. P. 635-645.

Mattson M.P. Antigenic changes similar to those seen in neurofibrillary tangles are elicited by glutamate and Ca^{2+} influx in cultured hippocampal neurons // Neuron. 1990. Vol. 4. P. 105-117.

Mattson M.P. ER calcium and Alzheimer's disease: in a state of flux // Sci. Signal. 2010. Vol. 3. P. 10.

Mattson M.P., Cheng B., Davis D. et al. beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity // J. Neurosci. 1992. Vol. 12. P. 376-389.

McKee A.C., Kosik K.S., Kennedy M.B. et al. Hippocampal neurons predisposed to neurofibrillary tangle formation are enriched in type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1990. Vol. 49. P. 49-63.

Nelson O., Tu H., Lei T. et al. Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca^{2+} leak function of presenilin 1 // J. Clin. Invest. 2007. Vol. 117. P. 1230-1239.

Nelson T., Cui C., Luo Y. et al. Reduction of β-Amyloid Levels by Novel Protein Kinase Ce Activators // J. Biol. Chem. 2009. Vol. 284. P. 34514-34521.

Nunan J., Smal D. Regulation of APP cleavage by α-, β- and γ-secretases // FEBS lett. 2000. Vol. 483. P. 6-10.

Oddo S., Caccamo A., Kitazawa M. et al. Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease // Neurobiol. Aging. 2003. Vol. 24. P. 1063-1070.

Page M.R., Baumann K., Tomioka M. et al. Generation of Ab38 and Ab42 Is Independently and Differentially Affected by Familial Alzheimer Disease-associated Presenilin Mutations and gamma-Secretase Modulation // J. Biol. Chem. 2007. Vol. 283. № 2. P. 677-683.

Pierrot N., Ghisdal P., Caumont A.S. et al. Intraneuronal amyloid-beta1-42 production triggered by sustained increase of cytosolic calcium concentration induces neuronal death // J. Neurochem. 2004. Vol. 88. P. 1140-1150.

Pierrot N., Santos S. F., Feyt C. et al. Calcium-mediated transient phosphorylation of tau and amyloid precursor protein followed by intraneuronal amyloid-beta accumulation // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281. P. 39907-39914.

Priller C., Dewachter I., Vassallo N. et al. Mutant presenilin 1 alters synaptic transmission in cultured hippocampal neurons // J. Biol. Chem. 2007. Vol. 282. P. 1119-1127.

Raux G., Guyant-Marechal L., Martin C. et al. Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease: an update // J. Med. Genet. 2005. Vol. 42. № 10. P. 793-795.

Roses A.D. On the discovery of the genetic association of Apolipoprotein E genotypes and late-onset Alzheimer disease // J. Alzheimers Dis. 2006. Vol. 9. № 3. P. 361-366.

Rutten B.P., Van der Kolk N.M., Schafer S. et al. Age-related loss of synaptophysin immunoreactive presynaptic boutons within the hippocampus of APP751SL, PS1M146L, and APP751SL/PS1M146L transgenic mice // Am. J. Pathol. 2005. Vol. 167. P. 161-173.

Ryazantseva M., Skobeleva K., Kaznacheyeva E. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin-1 mutation M146V affects store-operated calcium entry: does gain look like loss? // Biochimie. 2013. Vol. 95. P. 1506-1509.

Ryazantseva M., Skobeleva K., Kaznacheyeva E. Disregulation of Calcium Homeostasis Connected with Familial Alzheimer's Disease // Biophys. J. 2014. Vol. 106. P. 548a-549a.

Rybalchenko V., Hwang S.Y., Rybalchenko N. et al. The cytosolic N-terminus of presenilin-1 potentiates mouse ryanodine receptor single channel activity // Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2008. Vol. 40. P. 84-97.

Sato T., Diehl T.S., Narayanan S. et al. Active gamma-secretase complexes contain only one of each component // J. Biol. Chem. 2007. Vol. 282. № 47. P. 33985-33993.

Saura C.A. Choi S.Y., Beglopoulos V. et al. Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration // Neuron. 2004. Vol. 42. P. 23-36.

Scheuner D., Eckman C., Jensen M. et al. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease // Nat. Med. 1996. Vol. 2. № 8. P. 864-870.

Schneider I., Reverse D., Dewachter I. et al. Mutant presenilins disturb neuronal calcium homeostasis in the brain of transgenic mice, decreasing the threshold for excitotoxicity and facilitating long-term potentiation // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 11539-11544.

Shen J., Bronson R.T., Chen D.F. et al. Skeletal and CNS defects in presenilin-1-deficient mice // Cell. 1997. Vol. 89. № 4. P. 629-639.

Shilling D., Mak D.O., Kang D.E. et al. Lack of evidence for presenilins as endoplasmic reticulum Ca2+ leak channels // J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287 P. 10933-10944.

Sinha S., Lieberburg, I. Cellular mechanisms of beta-amyloid production and secretion // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 11049-11053.

Sterniczuk R., Dyck R.H., Laferla F.M. et al. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 1. Circadian changes // Brain Res. 2010a. Vol. 1348 P. 139-148.

Sterniczuk R., Antle M.C., Laferla F.M. et al. Characterization of the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease: part 2. Behavioral and cognitive changes // Brain Res. 2010b. Vol. 1348. P. 149-155.

Stutzmann G. E., Caccamo A., LaFerla F. M. et al. Dysregulated IP3 signaling in cortical neurons of knock-in mice expressing an Alzheimer's-linked mutation in presenilin1 results in exaggerated Ca^{2+} signals and altered membrane excitability // J. Neurosci. 2004. Vol. 24. P. 508-513.

Stutzmann G. E., Smith I., Caccamo A. et al. Enhanced ryanodine receptor recruitment contributes to Ca^{2+}

disruptions in young, adult, and aged Alzheimer's disease mice // J. Neurosci. 2006. Vol. 26. P. 5180-5189.

Supnet C., Bezprozvanny I. The dysregulation of intracellular calcium in Alzheimer disease // Cell Calcium. 2010. Vol. 47. P. 183-189.

Tanemura K., Chui D.H., Fukuda T. et al. Formation of tau inclusions in knock-in mice with familial Alzheimer disease (FAD) mutation of presenilin 1 (PS1) // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281. P. 5037-5041.

Terwel D., Lasrado R., Snauwaert J. et al. Changed Conformation of Mutant Tau-P301L Underlies the Moribund Tauopathy, Absent in Progressive, Nonlethal Axonopathy of Tau-4R/2N Transgenic Mice // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280. P. 3963-3973.

Thibault O., Gant J.C., Landfield P.W. Expansion of the calcium hypothesis of brain aging and Alzheimer's disease: minding the store // Aging Cell. 2007. Vol. 6. P. 307-317.

Thinakaran G., Koo E.H. Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283. P. 29615-29619.

Toescu E.C., Verkhratsky A. The importance of being subtle: small changes in calcium homeostasis control cognitive decline in normal aging // Aging Cell. 2007. Vol. 6 № 3. P. 267-273.

Tu H., Nelson O., Bezprozvanny A., Wang Z. et al. Presenilins form ER Ca^{2+} leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations // Cell. 2006. Vol. 126. P. 981-993.

Wang H.Y., Lee D.H. D'Andrea M.R. et al. beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. № 8. P. 5626-5632.

Wang R., Wang B., He W. et al. Wild-type presenilin 1 protects against Alzheimer's disease mutation-induced amyloid pathology // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281. P. 15330-15336.

Watanabe H., Smith M. J., Heilig E. et al. Indirect regulation of presenilins in CREB-mediated transcription // J. Biol. Chem. 2009. Vol. 284. P. 13705-13713.

Wiley J., Hudson M., Kanning K. et al. Familial Alzheimer's disease mutations inhibit gamma-secretase-mediated liberation of b-amyloid precursor protein carboxy-terminal fragment // J. Neurochem. 2005. Vol. 94. P. 1189-1201.

Wolfe M.S. When loss is gain: reduced presenilin proteolytic function leads to increased Abeta42/Abeta40. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease // EMBO Rep. 2007. Vol. 8. № 2. P. 136-140.

Wu B., Yamaguchi H., Lai F.A. et al. Presenilins regulate calcium homeostasis and presynaptic function via ryanodine receptors in hippocampal neurons. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. Vol. 110 P. 15091-15096.

Yoshikai S., Sasaki H., Doh-ura K. et al. Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene // Gene. 1990. Vol. 87. № 2. P. 257-263.

Yu H., Saura C.A., Choi S.Y. et al. APP processing and synaptic plasticity in presenilin-1 conditional knockout mice // Neuron. 2001. Vol. 31. № 5. P. 713-726.

Zhang C., Wu B., Beglopoulos V. et al. Presenilins are essential for regulating neurotransmitter release. // Nature. 2009a. Vol. 460. P. 632-636.

Zhang H., Sun S., Herreman A. et al. Role of presenilins in neuronal calcium homeostasis. // J. Neurosci. 2009b. Vol. 30. P. 8566-8580.

Zhang D., Zhang C., Ho A. et al. Inactivation of presenilins causes pre-synaptic impairment prior to post-synaptic dysfunction. // J. Neurochem. 2010. Vol. 115. P. 1215-1221.

Формирование пусковых факторов амилоидоза нейронов и активация теплозащитных механизмов латентной стадии болезни Альцгеймера

А.В. Мальцев, О.В. Галзитская

Содержание

1. Введение
2. Метаболизм Аβ-пептидов в нормально функционирующих нейронах
3. Особенности синтеза белка в нейронах
4. Этиология и патогенез болезни Альцгеймера
5. Белки предшественники амилоидов
6. Выявление пусковых факторов амилоидоза нейронов в начальной стадии болезни Альцгеймера
7. Образование конформационно модифицированных наноамилоидов с разной архитектурой
8. Формирование наноамилоидных олигомеров и фибриллярных структур
9. Идентификация сайтов в белковой цепи, ответсвенных за β-агрегационную активность
10. Энергорегулирующие защитные механизмы
11. Тау-белки нейронов
12. Образование нейрофибриллярных сплетений из гиперфосфорилированных тау-белков
13. Сбой защитных механизмов
14. Роль фосфорилирования транспортных белков в нейронах
15. Заключение

1. Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет все возрастающую проблему для национальных систем здравоохранения мирового сообщества (Salloway et al., 2008). Распространение БА напрямую связано с высокой продолжительностью жизни, достигнутой в развитых странах. В возрастной группе 55–75 лет число случаев БА удваивается каждые 5 лет.

По данным Альцгеймеровской ассоциации, в США в 2007 г. зарегистрировано 5,1 млн пациентов с БА, а к 2050 г. количество пациентов составит 13 млн (Мальцев, Галзитская, 2010). По данным международной группы экспертов, в 2005 г. 24,3 млн

Сокращения: АК – аминокислоты; АРС – аминоацил-тРНКсинтетазы; БА – болезнь Альцгеймера; ИНФС – интранейрональные нейрофибриллярные сплетения; ММ – молекулярные массы; НДЗ – нейродегенеративные заболевания; СМЖ – спинномозговая жидкость; ТБ – тау-белок; APP – белок предшественник амилоида; Аβ – β-амилоидный пептид; CDK-5 – циклин-зависимая киназа-5; GSK-3β – киназа гликоген синтазы-3β; SAPK-1 – киназа стресс-активированного белка-1; SELDI-TOF-MS – масс-спектрометрия с поверхностной матричной лазерной десорбцией/ионизацией образца.

человек во всем мире страдали деменцией, в большинстве случаев обусловленной БА. Прогнозируется, что к 2020 г. в мире 42,3 млн человек будут страдать деменцией, а к 2040 г. их численность достигнет 81,1 млн (Low, Anstey, 2009). Общественные затраты на преодоление последствий БА очень высоки и продолжают расти. В их число входят прямые медицинские расходы на лечение и реабилитацию больных, содержание домов престарелых, и немедицинские – на домашний уход за больным, а также непрямые – за счет потери производительности как пациента, так и человека, заботящегося о нем (Meek et al., 1998). Приводимые в фармакоэкономических исследованиях оценки показывают, что ежегодные затраты на БА по всему миру составляют около 160 млрд. долларов (Wimo et al., 2006), из них только в США расходуется до 100 млрд. долларов.

Показатели отечественной медицинской статистики распространения БА являются значительно заниженными по сравнению с мировыми данными. Популяционное эпидемиологическое исследование, проведенное в Центре по изучению болезни Альцгеймера (Гаврилова и др., 2010; Герасимов, 2000), показало, что 4,5% пожилых жителей Москвы (60 лет и старше) страдают БА. На территории РФ в 2004 г. проживало около 2 млн человек с деменцией (Белоусов и др., 2005), при этом ежегодные прямые и косвенные затраты в связи с данным заболеванием составляют в РФ до 5 млрд долларов.

Более ста лет назад Альцгеймер показал, что при БА на срезах мозга больных обязательно присутствуют сенильные бляшки и фибриллы. Посмертная диагностика БА выявляет в различных отделах мозга специфические белковые отложения в форме протофибрилл, фибрилл и бляшек, состоящих из Аβ-пептида и других белков. Факты экспериментальных и клинических исследований свидетельствуют о «системном кризисе здравоохранения в отношении БА» в мировом масштабе: в настоящее время не существует ни эффективных диагностических средств (Louw et al., 2007), ни прижизненной профилактики и терапии этих заболеваний. Несмотря на то что БА возникает спорадически в 95% случаев (Hoyer, 2000) или более чем в 98% случаев (Bertram et al., 2005), изучение процессинга APP, образования Аβ-пептида (Аβ) и процесса гибели нейронов при амилоидозе основываются на данных, полученных при генетических исследованиях. Одно из возможных составляющих патогенеза БА генетической формы – образование патологических форм аполипопротеина Е. По данным авторов (Lehtimäki et al., 1995), вероятность заболевания БА в 18 раз возрастает у лиц, носящих гетеро- или гомозиготные формы аполипопротеина Е ε4 (Williams et al., 1997).

Многие исследователи до сих пор считают, что основным виновником в развитии спорадических форм БА являются Аβ-пептиды, которые входят в состав бляшек и фибрилл. При этом определенная роль отводится повышению синтеза белка предшественника Аβ-пептида (APP, amyloid precursor protein) и переключению процессинга APP на амилоидный путь с образованием больших концентраций молекул Аβ (Li et al., 2012; Ma et al., 2012).

Первопричиной амилоидоза нейронов и их гибели при БА является накопление постсинтетических фрагментов Аβ, содержащих 40 или 42 аминокислотных остатков. Часть фрагментов приобретает структуру нормально функционирующих Аβ,

другая часть конформационно модифицируется в структуру патогенных Аβ. Вероятно, настало время пересмотреть имеющийся экспериментальный и клинический материал с новых позиций. Требуются новые знания о спорадических формах БА, о природе пусковых факторов конформационных перевоплощений фрагментов Аβ из нормально функционирующих белков в качественно новые образования нано-β-амилоиды (нано-Аβ), которые выходят из-под контроля нейронов и организма и ведут «самостоятельный образ существования», приводя к гибели нейронов.

2. Метаболизм Аβ-пептидов в нормально функционирующих нейронах

В результате многочисленных исследований сформировались представления, согласно которым Аβ-пептиды являются небольшими фрагментами большого белка предшественника амилоидов (APP). В результате протеолитического расщепления APP β-секретазой образуется фрагмент С99, а затем пептидные фрагменты Аβ(1-40) и Аβ(1-42) действием γ-секретазой (Figueiredo-Pereira et al., 1999). Было показано, что APP может расщепляться каспазами. Гидролиз APP каспазой-3, -6, -8 или -9 приводит к образованию пептида С31, который принимает участие в гибели нейронов при БА и повышает продукцию Аβ-пептидов. Эти нормальные, хорошо растворимые в водных растворах С31-пептиды обнаруживаются в здоровом организме повсеместно: в тканях мозга, спинномозговой жидкости, плазме крови, моче, других органах, тканях и клетках (Shoji et al., 1992).

При физиологических концентрациях после процессинга γ-секретазами постсинтетические фрагменты Аβ приобретают новую конформацию в результате сворачивания в системе шаперонов. В результате образуются нативные Аβ, имеющие в белковой структуре преобладание α-спиралей, хорошо растворимых в водных растворах. Эти с нормальной конформацией Аβ-пептиды выполняют физиологические функции и попадают в спинномозговую жидкость (СМЖ). В СМЖ, а затем в крови Аβ подвергаются последовательному гидролизу. Комбинированными методами с помощью масс-спектрометрии с поверхностной матричной лазерной десорбцией/ионизацией образца (SELDI-TOF-MS) и при участии моноклонального антитела 6E10 в СМЖ здоровых добровольцев и пациентов с БА были обнаружены многочисленные промежуточные продукты гидролиза Аβ-пептидов: Аβ(2-14), Аβ(1-17), Аβ(1-18), Аβ(1-33), Аβ(1-34), Аβ(1-37), Аβ(1-38), Аβ(1-39), Аβ(1-40) и Аβ(1-42) (Maddalena et al., 2004). Интересно, что вводимый мышам внутривенно Аβ(1-40) беспорядочно гидролизируется в организме с периодом полураспада в 2,5–3,0 мин. Через 5 минут после введения в желчи были обнаружены продукты гидролиза Аβ(1-40): Аβ(6-39), Аβ(1-33), Аβ(4-36), Аβ(6-20), Аβ(3-35), Аβ(4-37), Аβ(1-37), Аβ(1-38), Аβ(1-39), Аβ(1-40) (Ghiso et al., 2004).

Все перечисленные выше разновидности Аβ-пептидов являются фрагментами (промежуточными полупродуктами) гидролиза нормальных Аβ в результате протеолитического действия многочисленных неспецифических к Аβ-пептидам ферментов: ангиотензин-превращающего и эндотелин-превращающего фермен-

тов, металлопротеиназы-9, инсулизина, плазмина и неприлизина (Nalivaeva et al., 2008).

Были изучены аминокислотные последовательности и молекулярные массы (ММ) Аβ-пептидов человека: Аβ(1-40) с ММ 4329 и номерами аминокислот от 1 до 40, начиная с N-конца, +H3N-Asp-Ala-Glu-Phe-Arg-His-Asp-Ser-Gly-Tyr-Glu-Val-His-His-Gln-Lys-Leu-Val-Phe-Phe-Ala-Glu-Asp-Val-Gly-Ser-Asn-Lys-Gly-Ala-Ile-Ile-Gly-Leu-Met-Val-Gly-Gly-Val-Val-COO-, а также Аβ (1-42) с ММ 4514 и номерами аминокислот от 1 до 42, начиная с N-конца, отличающийся от пептида Аβ(1-40) двумя дополнительными аминокислотными остатками Ile-Ala на С-конце (Roher et al., 1993). Все аминокислоты, из которых состоят Аβ-пептиды, являются L-аминокислотами. Это связано с тем, что в мозге D-аминокислоты не подвергаются протеолитическому процессингу (Cribbs et al., 1997).

Широкие экспериментальные исследования выявили экспрессию гликопротеида APP и образование Аβ(1-40) и Аβ(1-42) в различных тканях эмбриона человека: высокое содержание обнаружено в мозге (Kang et al., 1987), а также в сердце, селезенке и значительно меньше в печени (Mita et al., 1988), Аβ обнаружены в легких и плаценте (Sprecher et al., 1993), семенниках и сперме (Fardilha et al., 2007), заднем корешке, кишечном и тройничном ганглиях, надпочечниках, мегакариоците и гипофизе (Arai et al., 1991), кровеносных сосудах (Roher et al., 1993), в спинно-мозговой жидкости (Vigo-Pelfrey et al., 1993), плазме крови (Liu et al., 2005), фибробластах (Van Nostrand, Cunningham, 1987), тромбоцитах (Gevaert et al., 2003) и лейкоцитах (König et al., 1992). Разными авторами показано, что в цереброспинальной жидкости здоровых добровольцев и пациентов с БА физиологическая концентрация Аβ(1-40) колеблется в широких пределах от 5 до 25 нг/мл или от 1 до 6 нМ (Gelfanova et al., 2007), у мышей линии Tg2576, представляющей собой трансгенную модель человеческой БА, эта концентрация составляет 20 нг/мл или 5 нМ (Lanz et al., 2006).

3. Особенности синтеза белка в нейронах

Хорошо известно, что необходимыми метаболитами для биосинтеза белков в клетке являются аминокислоты (АК), АТР, аминоацил-тРНКсинтетазы (АРС) и тРНК. Активирование АК осуществляется в два этапа: сначала на АРС в присутствии АТР происходит активирование АК: АК + АТР-АРС ↔ АК-АМР-АРС + PPi, где АК-АМР – аминоациладенилат (он остается в комплексе с АРС), PPi – пирофосфат; затем происходит акцептирование АК молекулой тРНК: АК-АМР + тРНК ↔ АК- тРНК, где АК-тРНК – аминоацил-тРНК. На этом этапе АК присоединяется к 2'- или 3'-гидроксильной группе рибозы на 3'-конце молекулы тРНК (Ibba, Soll, 2000). Для биосинтеза белка из активированных аминокислот необходимо участие мРНК, рибосомы и аминоацил-тРНК. Синтез белка в нейронах центральной нервной системы должен незамедлительно реагировать на любые изменения гомеостаза снижением или увеличением интенсивности синтеза белка (по единственному принципу – выживает тот, кто быстрее получит информацию, обработает ее и адекватно на нее прореагирует). В процессе эволюционного развития нейронов мозга

для синтеза белка в нейронах были созданы особые условия и сняты все ограничения, используемые в биохимических реакциях метаболизма живой материи (Ашмарин, 2001). Синтез белка в нейронах является основным преобразователем всех эндогенных и экзогенных информационных потоков, и от надежности этого процесса зависит не только судьба индивида, но существование и процветание популяции в целом. АК являются для нервной ткани источником синтеза большого числа биологически важных соединений, таких как специфические белки, пептиды, нейромедиаторы, гормоны, витамины, биологически активные амины и др. Интенсивность биохимических реакций контролируется и ограничивается количеством каждого из субстратов, принимающих участие в реакции. Для белка единственным и самым важным расходным субстратом является АК, и природа позаботилась о том, чтобы активность важного информационного преобразователя не зависела от ограничения АК при продолжительном интенсивном белковом синтезе.

Постоянство качественного и количественного состава АК, АРС и АТР в метаболических фондах мозга обеспечивается такими взаимосвязанными процессами, как поступление этих метаболитов из циркулирующей крови, отток их из мозга в кровь и участие в реакциях внутриклеточного метаболизма. В центральной нервной системе организма все эти процессы сбалансированы слаженным функционированием гомеостатических механизмов, гематоэнцефалическим барьером и мембранным транспортом АК (Ашмарин, 2001). Важную роль в поддержании стабильности высоких концентраций метаболитов синтеза белка играет гибель «фуражных» нефункциональных нейронов от апоптоза. Ежедневно головной мозг теряет около 5 000 000 нейронов из исходного пула в 100 млрд. (Этинген, 2003). При этом гибнут нейроны, не имеющие функциональной нагрузки. В процессе гибели клеток происходит экспонирование на их поверхность разнообразных молекул (cell-death associated molecules (CDAM)). От сочетания экспонированных CDAM зависит, будет ли ответ организма специфическим или неспецифическим иммунным (Zitvogel et al., 2010). Показано, что в условиях апоптоза в межклеточное пространство так же секретируются аминокислоты и АРСазы (Wakasugi, Schimmel, 1999a). При этом некоторые АРСазы начинают выполнять неканонические функции и обеспечивают своевременную ликвидацию продуктов апоптоза (Wakasugi, Schimmel, 1999b). Состав пула свободных АК мозга при нормальных физиологических условиях достаточно стабилен. АК фонд мозга человека составляет в среднем 34 мкмоль на 1 г ткани, что значительно превышает их содержание, как в плазме крови, так и в спинномозговой жидкости (Раевский, 1988). Изучение конкурентных отношений в транспорте АК выявило наличие в нейронах восьми типов мембранотранспортных систем, имеющих ряд особенностей (Ашмарин, 2001):

- перенос АК часто происходит против высоких концентрационных градиентов;
- этот процесс энергозависим;
- на него влияют температура и pH среды;
- он ингибируется анаэробным состоянием клеток;
- перенос АК связан с активным мембранным транспортом ионов, например он Na^+-зависим;

● обнаружено конкурентное торможение мембранного транспорта одних АК другими (Ашмарин, 2001).

Эксперименты показывают, что процесс синтеза белка идет с освобождением большого количества свободной энергии (Четверин, Спирин, 1983). Из анализа энергетического баланса выше представленных реакций видно, что обе реакции сами по себе не дают выигрыша свободной энергии (гидролиз в стандартных условиях) и, следовательно, эти реакции не должны протекать с большим сдвигом в сторону синтеза. Если в естественных условиях PPi гидролизуется пирофосфатазой до ортофосфата в параллельной реакции, то общий энергетический баланс составит n · 60 кДж на 1 моль белка: $nPPi + nH_2O \rightarrow 2nP - n \cdot 30$ кДж/моль.

Недавние исследования по протеомному составу мозга умерших людей с БА и здоровых людей выявило 827 уникальных белков. Среди этих белков 227 были найдены у 9 из 10 пациентов с БА. Из этих 227 белков 69 отличались по уровню по сравнению со здоровым мозгом: уровень 37 белков был увеличен, а 32 – уменьшен значительно (Musunuri et al., 2014). Из этих 69 белков 46 ранее были уже упомянуты в работах по протеомному и иммуногистохимическому изучению как связанные с БА. 23 белка из 69 пока никак не упоминались в качестве связанных с БА. Среди белков с увеличенным уровнем при БА оказались белки, связанные с энергетическим метаболизмом мозга, такие как: аспартатаминотрансферазы, альдегид дегидрогеназы, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы, транскетолазы, глутатион S-трансферазы P, карбоангидразы 2, α-енолаза, малат-дегидрогеназа и сывороточный альбумин (Musunuri et al., 2014).

4. Этиология и патогенез болезни Альцгеймера

Описано несколько генетически гетерогенных форм БА, которые составляют небольшую часть (5–7%) от спорадических форм БА. Некоторые специалисты (Рогаев, 1999) считают, что спорадические случаи, к которым относится подавляющее большинство пациентов с БА, также могут быть обусловлены мутациями или полиморфизмами в генах, а патогенная экспрессия генетической аномалии находится под влиянием других генов. Однако роль мутаций или полиморфизмов в пресенилинах в развитии спорадических форм поздней БА (т.е. сенильной деменции альцгеймеровского типа) пока не установлена. Показано, что некоторые мутации в гене белка предшественника Аβ-пептида (APP) ответственны за увеличение продукции Аβ-пептида, из которого формируются амилоидные (сенильные) бляшки, которые представляют собой один из главных нейроморфологических феноменов заболевания. В 1991 г. была предложена «амилоидная гипотеза», согласно которой базовой причиной заболеваний являются отложения Аβ-пептида в виде агрегированных скоплений (фибрилл и бляшек) в экстрацеллюлярных пространствах коры головного мозга, которые обладают нейротоксическими свойствами и вызывают развитие дегенеративных изменений в ближайших (окружающих) нейронах (Hardy, Allsop, 1991; Mudher, Lovestone, 2002). В соответствии с этой гипотезой аномальный амилоидогенез предшествует нейрофибриллярным изменениям, выступая в качестве

главной причины нейрональной дисфункции и гибели нейронов. Сравнительное морфометрическое исследование биопсийного и аутопсийного материала показало, что развитие (тяжесть) деменции альцгеймеровского типа, отражающее прогрессирование заболевания, мало коррелирует с количеством амилоидных бляшек и фибрилл и в основном коррелирует с плотностью нейрофибриллярных волокон и клубков, а также с утратой синапсов (Braak, Braak, 1996).

Одна из гипотез возникновения БА базируется на интрацеребральном отложении патогенных нано-Аβ, что характерно, однако, далеко не для всех случаев БА. Для дифференциации молекул Аβ с физиологической конформацией (фАβ) от молекул-частиц Аβ с модифицированной конформацией введена абривиатура «нано-Аβ» для отличия этих двух продуктов β-процессинга APP. Интрацеребральное отложение патологического нано-Аβ (Lannfelt et al., 1995; Southwick et al., 1996), помимо БА, возможно при синдроме Дауна, врожденных церебральных гематомах с амилоидозом фамильной формы и нормальном старении (Fisher et al., 1994). Нано-Аβ является нерастворимым фрагментом большого трансмембранного гликопротеина, или APP. Механизм отложения нано-Аβ в настоящее время неизвестен. Согласно одной из предлагаемых гипотез, это обусловлено точечной генной мутацией, в результате которой образуется патологический Аβ (Lannfelt et al., 1995; Yanagisawa et al., 1992). Некоторые авторы придают важное значение возникающим при БА факторам, приводящим к переходу растворимого Аβ в нерастворимый нано-Аβ. К ним, в частности, относятся сдвиг pH межклеточной среды в кислую сторону, недостаточность процессов митохондриального окисления, повышение содержания свободных радикалов. Показано также, что при БА имеет место снижение активности лизосомальных гидролаз (Smyth et al., 1994), что, в свою очередь, может быть причиной нарушенной резорбции Аβ. По нашему мнению, данные факты можно трактовать с точностью до наоборот. В некоторых публикациях, посвященных патоморфологии БА, приводятся противоположные результаты, подтверждающие нашу точку зрения (Perlick, Mattis, 1994). Хорошо известно, что фибриллярный амилоид откладывается на стенках церебральных сосудов и в паренхиме головного мозга в виде так называемых «сенильных бляшек». Отложение амилоида приводит к гибели нейронов, находящихся рядом с сенильными бляшками. Одна из гипотез, объясняющих этот феномен, – активация Аβ кальциевых нейрональных каналов (с возрастанием содержания внутриклеточного кальция) и развитие свободнорадикального окисления нейрональных мембран (Wilkinson, 2001). Другие авторы (Anderson et al., 1995) предполагают, что нейрональная и ненейрональная гибель клеток при БА – результат экспрессии генов-индукторов апоптоза за счет воздействия APP и фАβ, что вполне согласуется с активацией NMDA-рецепторов с последующим увеличенным входом Ca^{2+} в клетку и развитием свободнорадикального окисления. Предложена гипотеза о возможности прямого токсического действия Аβ на глиальные структуры. Авторы убедительно показали (McRae et al., 1991), что при БА макрофаги микроглии активируются в результате предположительно прямого токсического действия фАβ. Данная гипотеза подтверждена другими исследователями (Maat-Schieman et al., 1994). Авторы считают, что результатом активации микроглии может быть деструкция нейронов.

В других исследованиях (Banati et al., 1995) приведены результаты, свидетельствующие о способности активированной микроглии при БА *de novo* синтезировать фАβ, что, соответственно, может обеспечить цикличность и прогредиентность патологического процесса. Однако авторы не уточняют, каким образом осуществляется этот синтез фАβ. Другим характерным морфологическим признаком БА являются интранейрональные нейрофибриллярные сплетения (ИНФС) (Avila et al., 2004; Johnson, Bailey, 2002), состоящие в основном из гиперфосфорилированного тау-белка (ТБ). Нейрофибриллярные сплетения не являются в строгом смысле морфологическим критерием БА; их наличие описано при различных церебральных дегенерациях (фронто-темпоральная атрофия, прогрессирующий надъядерный паралич и др.) (Ksiezak-Reding et al., 1996). Некоторые исследователи в настоящий момент отрицают самостоятельную патогенетическую значимость ТБ и считают, что скорее всего нейрофибриллярные сплетения являются следствием массивной и генерализованной смерти клеток мозга (Mori et al., 1995). Однако большинство исследователей считают, что гиперфосфорилирование ТБ вызывает транспортный коллапс в нейроне и последующую гибель нейрона (Chun, Johnson, 2007; Iqbal et al., 2005).

Анализ возможных причин заболевания БА, предложенных разными авторами на протяжении наиболее активного периода исследований в этой области, позволяет выделить три основные конкурирующие гипотезы. На начальных этапах исследований господствовала «холинергическая гипотеза» (Geula, Mesulam, 1995), согласно которой БА вызывается снижением синтеза нейромедиатора ацетилхолина. На этой гипотезе основано большинство существующих методов терапии, которые имеют невысокую эффективность. В 1991–1995 гг. была предложена «амилоидная гипотеза» (Braak, Braak, 1996), основанная в основном на генетических исследованиях (Yanagisawa et al., 1992), согласно которой базовой причиной заболевания являются отложения Аβ-пептида. В более поздних исследованиях различные авторы не обнаружили достоверной корреляции накопления бляшек с потерей нейронов. На этом фоне была сформирована тау-гипотеза (Iqbal et al., 2005; Johnson, Bailey, 2002), согласно которой каскад метаболических нарушений запускается гиперфосфорилированием ТБ и образованием из него нитей, которые начинают объединяться между собой, образуя нейрофибриллярные конгломераты в нервных клетках. Это вызывает дезинтеграцию микротрубочек и блокирует транспорт метаболитов практически всех метаболических систем в нейронах. Вовлечение в патологический процесс нейрональных отростков с их синапсами приводит к нейротрансмиттерному дефициту. Все эти события приводят к транспортному коллапсу, амилоидозу нейрона и его гибели (Chun, Johnson, 2007; Iqbal et al., 2005).

Клинические исследования БА показали, что основу патоморфологической картины БА составляют церебральный амилоидоз интра- и экстрацеллюлярной (преимущественно околососудистой) локализации, внутриклеточные нейрофибриллярные сплетения и гибель нейронов. Данные морфологические изменения образуются в определенной последовательности в разных отделах головного мозга, начиная с медиобазальных отделов лобных долей (т.н. «анторинальная кора»), осуществляющих холинергическую медиацию задних отделов головного мозга (Deller

et al., 1996). Затем эти морфологические изменения распространяются на область гиппокампа, амигдалярного ядра и медиальных отделов височных долей. Характерным для этой стадии, помимо описанных выше изменений, является достоверное снижение числа и плотности нейрональных синапсов в области гиппокампа (Bertoni-Freddari et al., 1997). Авторы считают, что такое распространение патологического процесса может быть объяснено высоким уровнем энергетических процессов в указанных областях головного мозга.

Таким образом, разные исследователи характеризуют БА двумя, на первый взгляд абсолютно не связанными друг с другом, явлениями, протекающими независимо друг от друга: во-первых, в межнейрональном пространстве на поверхности капилляров, в районе синапсов откладываются амилоидные сенильные бляшки и фибриллярные структуры, которые, в конечном итоге, приводят к гибели нейрона; во-вторых, в нейронах накапливаются нейрофибриллярные структуры-клубки и парные фибриллы гиперфосфорилированного ТБ, также способствующие гибели нейрона. Достаточно хорошо изучено, какую роль в патогенезе болезни играет каждый из этих процессов в отдельности, однако отсутствуют убедительные описания причинно-следственной связи между поражаемыми клеточными системами и гибелью нейронов. Нейрофибриллярные клубки и сенильные амилоидные бляшки возникают, казалось бы, независимо друг от друга и систем в целом. Не совсем ясно, что является пусковым звеном указанных патогенетических процессов.

Всестороннее исследование данного феномена позволяет сделать вывод о том, что между возникновением клубков и бляшек (то есть между гиперфосфориллированием ТБ и образованием нано-Аβ) должна быть тесная взаимосвязь. Теоретические исследования и сравнительный анализ многочисленных экспериментальных результатов свидетельствуют, что краеугольным фактором начального процесса патологии амилоидоза нейронов и ранней стадии БА являются особенности белкового синтеза в нейронах, запрограммированные в процессе эволюции центральной нервной системы, и образование порочного круга обоюдной стимуляции – индуцированное Аβ-увеличение интенсивности синтеза APP, которое влечет увеличение концентрации молекул Аβ.

5. Белки предшественники амилоидов

APP представляет собой крупный конститутивный трансмембранный белок. Существуют три изоформы APP, отличающиеся по молекулярному весу и представленные в разных соотношениях в нейроне (Tanaka et al., 1989). APP входит в семейство интегральных мембранных белков, в котором представлены также APLP1 и APLP2, которые обладают высокой степенью гомологии с APP, но не содержат последовательности Аβ (De Strooper, Annaert, 2000; Wasco et al., 1992, 1993). Хотя клеточные функции семейства APP до сих пор остаются не вполне понятными, существуют данные о том, что все три белка вовлечены в аксонный транспорт и необходимы для нормального развития нервной системы млекопитающих (Hardy, Selkoe, 2002). Он необходим для клеточной адгезии, пролиферации клеток

и межклеточных взаимодействий. При этом в мембраносвязанном состоянии APP могут выполнять сигнальную рецепторную функцию в процессе нейрогенеза (De Strooper, Annaert, 2001; Wilquet, De Strooper, 2004) и принимать участие в образовании и поддержании синапсов и увеличении синаптической плотности (Moya et al., 1994; Roch et al., 1994). APP в клетках локализован как в наружных плазматических, так и внутриклеточных мембранах, и его амилоидогенный протеолиз происходит преимущественно в компартментах мембран, богатых холестерином и ганглиозитом GM1 (так называемых липидных рафтах) (Cordy et al., 2003; Mattson, 1997).

Белки семейства APP (695-770 АК) состоят из гидрофильного N-концевого внеклеточного домена, гидрофобного трансмембранного домена и С-концевого цитоплазматического домена (Kang et al., 1987) (рис. 1). Сравнение ДНК человека и других млекопитающих показывает высокую степень консервативности гена APP: установлена 100-процентная идентичность APP-695 из мозга человека и обезьян. В нейронах ЦНС доминирует изоформа APP-695, а формы APP-770 и APP-751 присутствуют в следовых количествах (Stanton, Coetzee, 2004; Ещенко, 2004). APP синтезируется и гликозилируется в эндоплазматическом ретикулуме, затем переносится в комплекс Гольджи для созревания перед транспортом к клеточной поверхности (Molinari et al., 2004). Был идентифицирован ряд молекулярных шаперонов, которые принимают участие в данном процессе, в том числе при высокой температуре (HtrA) (Molinari et al., 2004). Представленные данные косвенно свидетельствуют об участии APP в энергетических процессах нейронов. В норме биологическая функция APP состоит в перемещении клеточного материала внутри нейронов, регуляции синапсогенеза и нейрональной трансмиссии, а также в обеспечении внеклеточной адгезии и миграции (Priller et al., 2006). Этот трансмембранный белок играет важную роль в росте нейрона, его выживании и в восстановлении после повреждений (Turner et al., 2003). Если молекула APP сразу после синтеза активно фосфорилируется (Tarr et al., 2002), то дальнейший процессинг происходит при участии α-секретазы по неамилоидному пути в направлении от центра к периферии (см. рис.1). Фосфорилированный APP продвигается к мембране, где от него отщепляются фосфаты (Alonso et al., 2006; von Bergen et al., 2000). При нормальных условиях около 90% APP расщепляется по неамилоидному пути (Steiner et al., 2008; Наливаева и др., 2008). Активация гена DYRK1A способствует фосфорилированию APP по Thr-668 *in vitro* и *in vivo*, которое может приводить к образованию фрагментов. При недостаточном фосфорилировании процессинг молекул APP переключается при участии β-секретазы на амилоидный путь. Финальное расщепление APP γ-секретазой при амилоидном процессинге может происходить по нескольким участкам. В результате образуются пептиды длиной 39–43 аминокислотных остатков, но преимущественными вариантами являются Aβ40 и Aβ42 (Steiner et al., 2008). Продукты расщепления APP α-секретазой (не амилоидный путь) также подвергаются дальнейшему протеолизу под действием γ-секретазы. Однако этот процесс не ведет к образованию амилоидного пептида. Важно отметить, что образующиеся в результате процессинга α- и γ-секретаз крупные и растворимые фрагменты APP выполняют защитные функции: имеют нейротрофические свойства, являются ней-

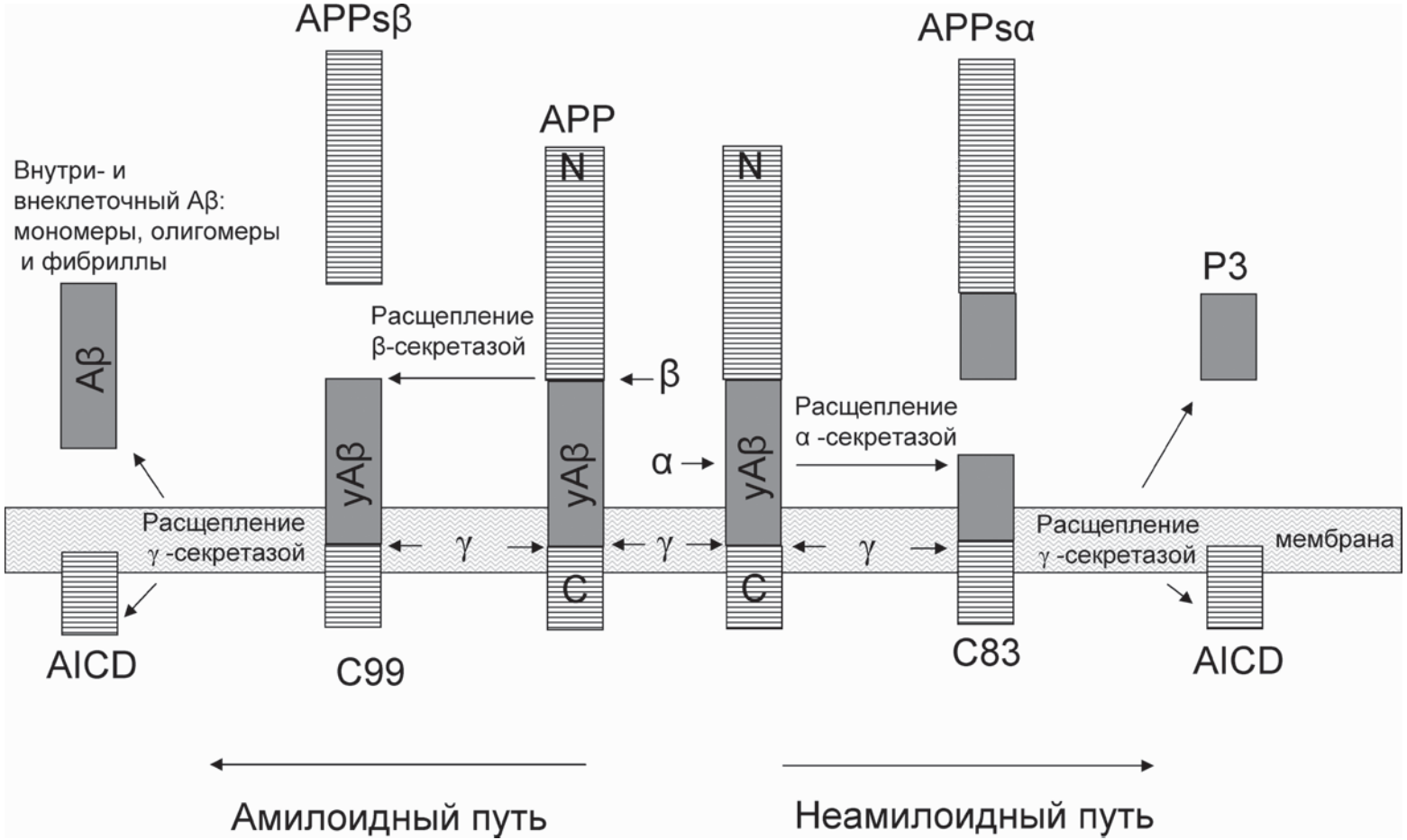


Рис. 1. Амилоидный и неамилоидный пути расщепления белка-предшественника амилоидного пептида. yAβ – участки будущих молекул Aβ в структуре белковой молекулы APP

ропротекторными и необходимы для нормального функционирования нейронов, в частности для синаптогенеза и для формирования памяти (Turner et al., 2003, 2007). Как при амилоидном, так и неамилоидном процессинге APP действие γ-секретазы ведет к образованию внутриклеточного концевого фрагмента (AICD), который является фактором транскрипции и, вероятно, регулирует уровень экспрессии как самого APP по принципу обратной связи, так и амилоид-деградирующего фермента неприлизина (Belyaev et al., 2009; Pardossi-Piquard et al., 2005).

6. Выявление пусковых факторов амилоидоза нейронов в начальной стадии болезни Альцгеймера

В ходе формирования патологического процесса при всех заболеваниях нервной системы, вызванных различными эндогенными и экзогенными нарушениями, нейротрофические факторы сдерживают развитие болезни и способствуют процессам компенсации и регенерации (Завалишин и др., 2001). Природа нашла и пути для ограничения фибриллогенной конформации белков. В подтверждение этого недавно было показано, что непарные β-тяжи, имеющиеся в нативных белках, защищаются от образования межмолекулярных β-листов путем замещения пролиновых и других заряженных аминокислотных остатков (Johansson, 2001).

Пусковые факторы БА обусловлены двумя основными причинами. Около 7% случаев заболевания обязаны аутосомно-доминантной наследственности и связаны с мутациями в одной из шести разных хромосом. У людей, имеющих мутации в одном из этих генов, обычно очень рано развивается БА – задолго до 60 лет. Детальный анализ последствий этих генных мутаций определил ключевые пути контроля патогенного прогрессирования этого заболевания. В литературе описано четыре гена, мутации которых связывают с возникновением деменции альцгеймерского типа (Ещенко, 2004). При синдроме Дауна трисомия 21 хромосомы приводит к утроению копий гена AD1, повышению в 1,5 раза скорости синтеза APP, задержке развития и прогрессирующему слабоумию к 30–40 годам (Stanton, Coetzee, 2004). Все генетические аномалии, вызывающие БА, проявляются и реализуются переключением процессинга APP с неамилоидного на амилоидный. Хотя генетические формы БА являются чрезвычайно ценными моделями для выяснения возможных молекулярных механизмов нейродегенерации при БА, следует помнить, что причиной более 90% случаев пусковых факторов БА являются спорадические причины эндогенного и экзогенного характера. Обычно врач сталкивается не с причинами и формой этого заболевания, а с отдельными возрастными проявлениями БА.

Учитывая высокую скорость синтеза белка и большие объемы белковой продукции, можно предположить, что в нейронах имеют место специализированные транспортные системы, осуществляющие (специфический) транспорт ATP, АК и APC к месту синтеза белка и транспортирующие из этого района PPi, фосфаты и AMP к митохондриям, где происходит ресинтез ATP. В нормальных физиологических условиях интенсивность синтеза белка может колебаться в широком физиологическом интервале. Однако при различных сверхпороговых воздействиях

на нейроны происходит увеличение синтеза белков, на метаболизме которых они специализируются (Nilsson, 2004). Если эти воздействия экстремальны, нейроны погибают по одному из сценариев: некроза, апоптоза или амилоидоза. Мы показали характерные отличия (Каминский и др., 2005) гибели нейронов при некрозе, апоптозе и амилоидозе. «Амилоидоз нейронов» может начаться с экстремального продолжительного увеличения тотального синтеза белка, в том числе и APP (Iwata et al., 2002; Smith et al., 2003), как ответная реакция нейронов на стрессовые воздействия. Экспериментально и в клинике показано, что мозговая травма сопровождается увеличением уровня APP, Ab и нейрофибриллярного белка и даже образованием бляшек (Thal et al., 1997), при этом они, как правило, локализованы в местах нарушенных афферентных связей (Thal et al., 1997). В активации выщепления Ab из APP при травмах мозга принимает непосредственное участие каспаза-3, которая связывается со специфическим сайтом на APP (Stone et al., 2002). Чрезвычайно интересные данные о повышении уровня мРНК APP и самого APP в коре мозга были получены в экспериментах при разрушении ацетилхолинсинтезирующего ядра Мейнерта и моделировании прекращения поступления к корковым нейронам основных медиаторов – норадреналина, серотонина и дофамина (Wallace et al., 1993). Авторы приходят к заключению, что индукция синтеза APP в коре является результатом утраты функциональной иннервации со стороны подкорковых структур. И как следствие – это приводит к повышению концентрации постреакционных молекул Аβ, которые после взаимодействия с шаперонами выполняют свои физиологические функции, а также по принципу обратной связи дополнительно стимулируют белковый синтез (Giasson et al., 2003; Ашмарин, 2001). При этом в зоне синтеза белка увеличивается концентрация свободных фосфатов, PPi и AMP, а концентрация ATP падает. Таким образом, усиление синтеза APP приводит к увеличению количества молекул Аβ, которые, в свою очередь, стимулируют синтез APP (Giasson et al., 2003; Ашмарин, 2001).

Другой возможной причиной гиперпродукции фрагментов Аβ-пептидов может быть рацемизация аминокислотных остатков в Аβ при БА, которая рассматривалась в обзоре (Kaneko et al., 1995). Пептиды Аβ(1-40) в форме солей соляной кислоты, но не коммерческий препарат Аβ(1-40) в форме соли трифторуксусной кислоты, при инкубации в фосфатном буферном солевом растворе в течение нескольких часов приобретали β-структуру, образовывали фибриллы и оказывали токсическое действие на культивируемые нейроны гиппокампа. Другие авторы (Kubo et al., 2002) показали, что Аβ(1-40) с рацемизированным аминокислотным остатком Ser26 ([D-Ser26] Аβ(1-40) растворим в водных растворах, не токсичен для нервных клеток и легко гидролизуется протеазами мозга. При изучении механизмов старения и БА авторы обратили внимание, что возможная рацемизация L-форм Ser и Asp в молекуле Аβ(1-40) в D-форму (в частности Ser26) является обычной модификацией при БА и является частью нормального процесса старения (Shapira et al., 1988). На основе этих данных была представлена гипотеза (Kaneko et al., 1995) о том, что процесс рацемизации сериновых аминокислотных остатков в Аβ является определяющим в нейродегенерации и образовании сенильных бляшек. При гистопатологии мозга пациентов с БА (Kubo et al., 2003) авторы выявили локализацию

рацемизированных остатков Ser26 внутри лимбической системы (наиболее рано повреждаемом месте при БА).

При БА наблюдается изменение в регуляции процессинга APP, приводящее к амилоидозу нейронов. Установлено, что в нормально фукционирующих нейронах триггером протеолитического расщепления белка предшественника амилоида (APP) между двумя путями процессинга: α-процессинг – неамилоидный и β-процессинг – амилоидный (при амилоидозе нейронов – амилоидогенный) – является реакция фосфорилирования APP. Торможение фосфорилирования APP приводит к переключению на амилоидный путь метаболизма с выщеплением Aβ (1-40) и Aβ (1-42). На роль катализаторов фосфорилирования APP претендует целый ряд ферментов: киназа гликоген синтазы-3β (GSK-3β), циклин-зависимая киназа-5 (CDK-5), киназа стресс-активированного белка-1 (SAPK-1) и протеинкиназа C, активированная в фосфоинозитидном цикле. Угнетение киназной активности в отношении APP манифестирует избыточной продукцией Aβ-пептида, что является одним из условий проагрегатной ситуации. Было показано, что процесс фосфорилирования APP происходит сразу после синтеза и, следовательно, в большей мере зависит от количества ATP в зоне синтеза белка (Lu et al., 2013). Таким образом, дефицит ATP вызывает подавление фосфорилирования APP, что автоматически переключает процессинг APP с неамилоидного на амилоидный со всеми вытекающими последствиями (см. рис. 1).

7. Образование конформационно модифицированных наноамилоидов с разной архитектурой

Не менее важным для нейронов является процесс постреакционного сворачивания фрагмента белковой молекулы Aβ с участием системы шаперонов в конформационную архитектуру нативной молекулы белка, которая только в таком состоянии может выполнять свои уникальные функции (Narayan et al., 2012). В нормальных физиологических условиях все молекулы Aβ при участии шаперонов приобретают физиологическую (нормальную) конформацию, выполняют свои функции и по принципу обратной связи поддерживают (на одном уровне) или активируют синтез APP, а затем в ликворе и крови последовательно расщепляются протеолитическими ферментами (Ghiso et al., 2004).

На основе экспериментального анализа пусковых факторов амилоидоза Aβ мы считаем, что при сложившейся ситуации процесс биосинтеза белка выходит из-под контроля нейрона. В результате происходит повышение концентрации постреакционных фрагментов, а затем Aβ-пептидов, которые стимулируют (по закону обратной связи) в нейроне синтез белка предшественника APP, и последующему β-, γ-процессингу подвергается большее количество APP. Если процесс наращивания в нейроне синтеза APP и количества Aβ-пептидов перестал регулироваться, то это приводит к гиперконцентрации постреакционных Aβ-фрагментов. Основная часть образованных Aβ-фрагментов взаимодействует с системой шаперонов и приобретает физиологически нормальную конформацию Aβ-пептидов. Однако физиологи-

ческий уровень шаперонов в нейронах, необходимый для эффективного контроля и коррекции сворачивания образованных *de novo* Аβ-фрагментов, не справляется с высокой концентрацией образующихся постреакционных фрагментов. Поэтому другая часть Аβ-фрагментов, которая осталась «не охваченной шаперонами», приобретает конформацию, устойчивую к окружающей среде: Аβ-фрагменты расплетаются частично или полностью (обратимая денатурация). Затем под влиянием взаимодействия аминокислотных остатков в расплетенных Аβ-фрагментах, pH и ионного состава окружающей среды, концентрации фрагментов Аβ в реакционном пространстве формируется вторичная структура, а затем образуются мономерные конформационно модифицированные пептиды – нано-Аβ.

Известно, что кроме нейронов в некоторых других дифференцированных клетках при определенных условиях конформационно неустойчивые фрагменты или молекулы белков с небольшой молекулярной массой, растворимые в водной среде и выполняющие транспортные или регуляторные функции, могут приобретать необычную, ненативную конформацию. При взаимодействии молекул таких белков с диполями воды вокруг белковой молекулы формируется «крепкая» гидратная оболочка. В результате формируются наномасштабированные биочастицы, устойчивые к биохимическим и иммунологическим атакам клеток и организма. Образуется особый класс: наночастицы биологического происхождения – бионаночастицы. Для некоторых нейронов это событие может послужить пусковым фактором гибели нейронов от амилоидоза. Мономерные нано-Аβ плохо растворимы в водных растворах, имеют в своем составе преимущественно β-структурную конформацию и гидрофобные участки. При этом молекулы меняют свои свойства, они выходят из-под контроля нейронов и организма и становятся самостоятельными объектами нано-Аβ (размером 1,2–1,5 и более нанометров), которые обладают патогенными функциями по отношению к нейронам. В определенной концентрации нано-Аβ включают каскад событий, приводящий к амилоидозу нейронов и их гибели. Наиболее известными являются конформационно модифицированные β-амилоиды и прионы – скрепи, которые обладают кроме способности к фибрилообразованию инфекционными свойствами (Prusiner, 1991) и могут передавать информацию о своей форме другим белкам (самовозобновляться) в организме у инфицированных животных – белковая наследственность (Prusiner, 1994, 1997). Эти объекты можно объединить как биогенные наночастицы, так как они имеют общие специфические особенности и закономерности: 1) без внешнего участия образуют олигомерные наночастицы больших размеров различной архитектуры: округлые, замкнутые, растворимые в биологических жидкостях (рис. 2а), и линейные (рис. 2б), плохо растворимые – предфибриллярной и фибриллярной (нерастворимые) структуры; 2) обладают пространственной памятью или «конформационной наследственностью»; 3) не гидролизуются эндогенными ферментами.

Анализ собственных и опубликованных результатов других исследователей показал, что в каскаде молекулярно-клеточных событий, ведущих к повреждению нервных клеток, развитию амилоидоза и патогенеза БА, участвуют наночастицы, образованные из конформационно модифицированных Аβ и других белков, а также клеточные структуры с нарушенными функциями (Wall et al., 2011; Maltsev et al.,

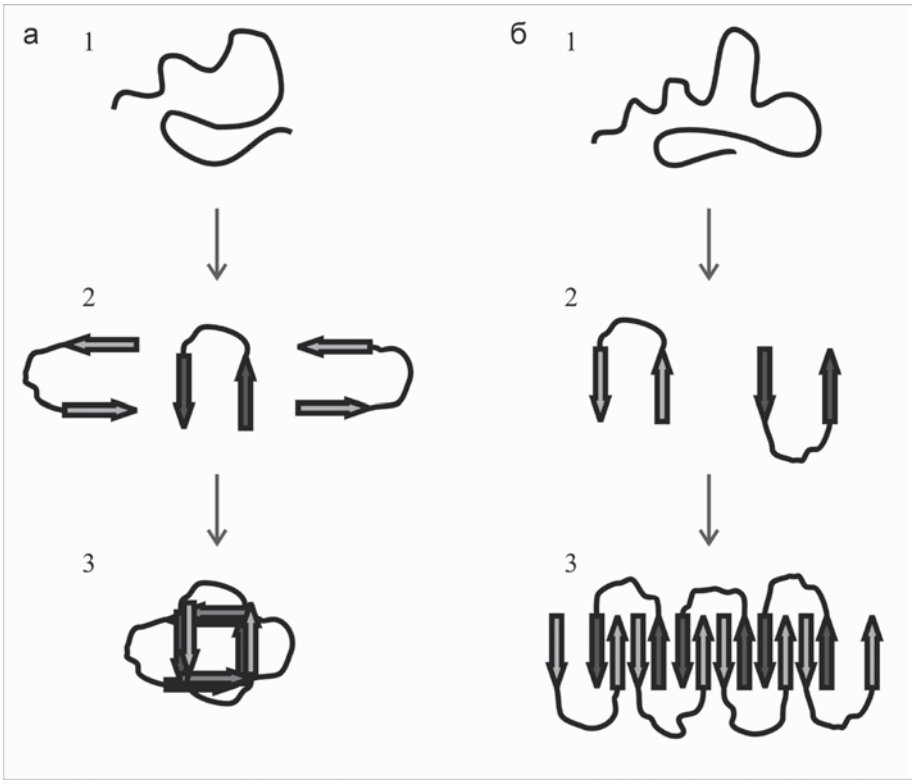


Рис. 2. Схема образования округлых олигомерных нано-β-амилоидов (а). Схема образования линейных олигомерных нано-β-амилоидов и протофибрилл (б)

1 – частично или полностью развернутый фрагмент β-амилоида после процессинга APP γ-секретазой; 2 – образование конформационно модифицированных β-амилоидов – мономерных нано-Аβ; 3 – олигомеры, состоящие из мономерных нано-Аβ

2011). Их участие в развитии амилоидоза нейронов и патогенеза нейродегенеративных заболеваний (НДЗ) осуществляется посредством активации амилоидогенных ферментных систем, конформационных перестроек и межмолекулярных взаимодействий между различными наночастицами некоторых конформационно модифицированных маркерных белков, характерных для НДЗ.

Склонность к конформационной модификации таких специфических белков проявляется при наличии хотя бы одного из условий: 1. Повышение локальной концентрации Аβ вследствие спорадически или генетически обусловленного избытка синтеза или усиления процессинга предшественника (APP). 2. Мутации, вызывающие аминокислотные замены в пептидной цепи низкомолекулярных белков, которые увеличивают их склонность к агрегации. 3. Функциональная недостаточность в нейронах системы шаперонов и механизма убиквитин-протеасомной деградации белков с аномальной конформацией.

Таким образом, начинается процесс амилоидоза. Локальное образование высокой концентрации гидрофобных мономерных нано-Аβ рядом с мембраной нейрона

вносит коррективы в основные функции мембраны: полупроницаемость, избирательность в поглощении веществ из среды, осмотическую стабильность и способность генерировать электрические потенциалы (влияя на транспорт ионов Ca^{2+}). Благодаря изменению электронной плотности на функциональных группах нано-Аβ изменяется характер их взаимодействия с водой, с ионами и другими веществами. В одном состоянии карбоксильные группы нано-Аβ селективно связывают ионы K^+, в другом – Na^+ (Линг, 2008) и ионы других металлов. Нано-Аβ активно связываются с двухвалентными металлами, которые участвуют в окислительном стрессе нейронов. При этом следует отметить, что многие работы указывают на то, что ионы Zn^{2+} ускоряют образование амилоидных фибрилл, так как уменьшается суммарный заряд нано-Аβ, увеличивается его гидрофобность и агрегационные свойства (Talmard et al., 2009). Также было показано, что ионы Zn^{2+} способствуют агрегации Аβ, когда пептид из α-спиральной конформации переходит в β-амилоидную структуру (Chen et al., 2006; Talmard et al., 2009). Также была изучена реакция образования координационной связи с ионами меди Cu^{2+} для фрагмента Аβ и было показано методом 1H ЯМР и методом спектроскопии, что His6, His13, His14, Tyr10 образуют координационные связи с ионом меди (Ma et al., 2006; Minicozzi et al., 2008). Эти события угнетают функциональное состояние нейронов, которое характеризуется изменением ряда параметров гомеостаза нейронов, их индукцией к дедифференцировке нейронов и вхождение в аберрантный, нескоординированный, летальный цикл в стадии G-2 (Гуляева, 2005). В первую очередь происходит резкое уменьшение синаптических контактов и уменьшение синапсов у нейронов (Singh et al., 2001).

Это приводит к образованию такого большого количества фрагментов молекул Аβ, при котором система сворачивания молекул Аβ в физиологическую конформацию с помощью шаперонов не справляется со своей задачей. Часть молекул Аβ минует встречу с шаперонами, оказывается в «свободном плавании», и сворачивание пептида происходит не по клеточному сценарию, а «диким» образом, по законам термодинамики и биохимии, в зависимости от состава окружающей среды, температуры и аминокислотного состава белковой молекулы. Экспериментально показано, что в условиях обратимой денатурации белковая молекула в зависимости от состава окружающей среды (инкубационной среды) и температуры может принимать широкий спектр кратковременных и устойчивых конформационных состояний (Maltsev et al., 2011). Таким образом, образуются конформационно модифицированные «молекулы-частицы наноамилоиды» (нано-Аβ). В структуре у этих нано-Аβ преобладают гидрофобные участки. В связи с этим они плохо растворимы в водных растворах и как следствие – обладают высокой агрессивностью к взаимодействию с другими молекулами, органеллами и мембранами, и предрасположены к образованию олигомеров нано-Аβ (Maltsev et al., 2011) с разной архитектурой. Они не контролируются нейронами и организмом, и с полным основанием их можно считать частицами нано-Аβ (Smyth et al., 1994). Находясь рядом с мембранами нейронов, нано-Аβ подавляют их физиологические функции, ингибируют работу синапсов и мембранных каналов, угнетают активность митохондрий и других внутриклеточных систем, способствуют развитию окислительного стресса

(Wilkinson, 2001). Эта ситуация может привести к амилоидозу нейрона, а при условии отсутствия периода покоя, в котором происходит восстановление функций всех клеточных систем, не исключена и гибель нейрона (Бехтерева, 1988). Плохо растворимые мономеры нано-Аβ обладают высокой активностью к образованию олигомеров нано-Аβ разной архитектуры (Maltsev et al., 2011). После образования олигомеров нано-Аβ их агрессивность по отношению к окружающим молекулам, органеллам и клеткам пропадает. Олигомеры нано-Аβ фибриллярной конфигурации (архитектуры) нерастворимы и образуют предфибриллярные образования, а затем из них формируются синильные бляшки и фибриллы. Олигомеры нано-Аβ с округлой (шаровидной) архитектурой растворимы в водной среде и мигрируют в ликвор, а затем в кровь (Maltsev et al., 2011).

Экспериментально показано, что разрушенные аксоны, особенно в острой стадии, могут служить источниками резко повышенного локально уровня APP, что неминуемо сопровождается отщеплением из него Аβ-пептида (Smith et al., 2003). Однако существуют данные, что APP может играть нейропротекторную и нейротрофическую роль, а также защищать нейроны от эксайтотоксичности (Choi et al., 1995; Furukawa et al., 1996; Mucke et al., 1996).

8. Формирование наноамилоидных олигомеров и фибриллярных структур

Как индивидуальность мономерные наноамилоиды существуют недолго. Стремясь скрыть гидрофобные участки, они взаимодействуют между собой, образуя более крупные олигомерные наночастицы с округлой замкнутой структурой (см. рис. 2а), внутри которой скрыты гидрофобные участки, и линейной предфибриллярной, а затем фибриллярной архитектурой (см. рис. 2б). При взаимодействии диполей воды с фиксированными зарядами аминокислотных остатков олигомера нано-Аβ прочность водородных связей между молекулами возрастает, и формируется упорядоченная водная структура вокруг олигомера нано-Аβ. Сильные гидрофобные взаимодействия в олигомере и плотная гидратная оболочка выполняют барьерную и защитную функцию между олигомером нано-Аβ и средой.

Округлые олигомеры нано-Аβ (см. рис. 2а) (Мальцев, Галзитская, 2010) хорошо растворимы в водных растворах, поэтому попадают в кровяное русло и при определенных условиях обнаруживаются в крови человека (Мальцев и др., 2008). Предфибриллярные, линейные структуры олигомеров нано-Аβ (см. рис. 2) самостоятельно без внешнего воздействия склонны к гомоагрегации *in vitro* (Chiti et al., 1999) и отложению в виде биохимически неактивных внутриклеточных включений и волокон, либо внеклеточных фибрилл амилоидных и синильных бляшек (Dobson, 1999), которые (по нашему мнению), в соответствии с нашей гипотезой, выполняют важные функции для поддержания работы органов и жизненно необходимых процессов организма в период интенсивной гибели нейронов.

Результаты многих исследований указывают на то, что образование амилоидной фибриллы является фундаментальным свойством белковых молекул дифференци-

рованных клеток в целом, а не только узкого класса так называемых амилоидогенных белков, связанных с амилоидными болезнями, как считалось вплоть до недавнего времени (Bucciantini et al., 2004; Dobson, 1999). При этом нормальные белки при образовании фибрилл становятся токсичными наноамилоидами (Bucciantini et al., 2004). В то же время известно, что незрелые водорастворимые фибриллы более цитотоксичны, чем зрелые нерастворимые амилоидные фибриллы. Структура этих токсичных незрелых фибрилл богата β-тяжами и должна быть универсальной, так как специфические антитела к предшественникам амилоидного пептида Аβ, связанного с болезнью Альцгеймера, могут связываться также с предшественниками амилоидных фибрилл, образующихся и из других белков, имеющих совсем иную аминокислотную последовательность (Kayed et al., 2003). Механизм токсичности этих предшественников, кажется, тоже должен быть сходным для фибрилл, образуемых различными наноамилоидами.

Тот факт, что белок может свернуться неправильно или образовать частично развернутое состояние наноамилоида, которое в дальнейшем подвергается необратимой агрегации, указывает на проблемы, которые могут возникнуть в ходе сворачивания белка. Неспособность белковой цепи свернуться в нативную структуру приводит к нарушению функции белка, а следовательно к болезни (Dobson, 1999). Среди конформационных болезней амилоидные болезни составляют особую группу. Общей чертой этих болезней является образование амилоидных фибрилл из нано-Аβ, в которых отдельные β-слои ориентированы перпендикулярно главной оси фибриллы. Образование фибрилл – яркий пример изменения конформации белковых молекул, связанного с увеличением доли β-структуры у наноамилоидов (Chiti et al., 1999; Fändrich et al., 2001). Образование фибрилл в общем случае зависит не от структуры белка-предшественника, а в значительной степени от его аминокислотной последовательности.

Понимание молекулярных механизмов образования фибрилл позволило бы объяснить причину возникновения этих болезней. Для некоторых белков были экспериментально определены участки, которые могут отвечать за образование амилоидных фибрилл. Показано, что образование фибрилл зависит от условий проведения эксперимента и что денатурирующие факторы способствуют образованию фибрилл: чтобы агрегировать, белки должны быть развернуты или частично развернуты (Dobson, 1999).

Агрегация пептидов и белков, связанных с амилоидозами такого типа, как диабет типа II, болезни Альцгеймера и Паркинсона, не требует предварительного полного разворачивания белков, так как эти белки в основном состоят из небольшого числа аминокислотных остатков и при физиологических условиях уже не структурированы (Rochet, Lansbury, 2000). Однако большинство нативно развернутых белков *in vivo* не агрегирует (Uversky et al., 2000). Данный факт указывает на то, что разворачивание белка является необходимым, но недостаточным условием для образования нано-Аβ и амилоидных фибрилл. Скорее всего, должны существовать специальные мотивы аминокислотной последовательности, которые, будучи доступны для растворителя, более подвержены агрегации, чем другие участки аминокислотной последовательности. Экспериментальные факты только подтверждают гипотезу о

том, что небольшие области белка ответственны за образование фибриллярных наноамилоидов (Von Bergen et al., 2000; Ivanova et al., 2004; Tenidis et al., 2000).

Так, встроенная в N-конец белковой молекулы амилоидогенная последовательность из шести аминокислотных остатков (STVIIE) вызывает процесс образования фибриллы у водорастворимого белка α-спектрина, SH3-домен, который не образует наноамилоидные фибриллы при этих же условиях (Esteras-Chopo et al., 2005). При этом в ядро нанофибриллы, недоступное протеазам, входят короткие последовательности из растворимого глобулярного белка, примыкающие к амилоидогенному участку. Таким образом, короткие амилоидогенные участки, доступные для внутримолекулярных взаимодействий, ускоряют реакцию самосборки, втягивая оставшуюся часть белка в фибриллярный агрегат.

Похожий результат был получен ранее для β2-микроглобулина мыши, который не образует амилоидов. В этом белке семь аминокислотных остатков были заменены на семь аминокислотных остатков из β2-микроглобулина человека (образующего амилоиды) в том месте, где наблюдается наибольшее различие между первичными структурами этих белков, остатки 83–89. Такая замена в белке приводит к образованию наноамилоидов *in vitro* (Ivanova et al., 2004). Следует отметить, что сам пептид (NHVTLSQ) образует наноамилоиды, а пептид, составленный из тех же аминокислот, но в случайном порядке (QVLHTSN), – нет (Ivanova et al., 2004). На основании полученных экспериментальных данных в работе предложена модель β-зигзагообразного стержня, который декорирован оставшейся частью белковой молекулы.

Идентификация таких амилоидогенных участков в белках открывает возможность использования их как мишени для предотвращения процесса образования нано-Aβ и амилоидных фибрилл.

9. Идентификация сайтов в белковой цепи, ответсвенных за β-агрегационную активность

Надежная идентификация β-агрегационных сайтов в белковой цепи важна для поиска терапевтических средств против таких заболеваний, как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, а также других, связанных с образованием наноамилоидов и отложением их в виде больших агрегатов различной архитектуры.

Группа исследователей описали метод поиска агрегационных областей в полипептидной цепи, способствующих образованию мономерных наноамилоидов и амилоидных фибрилл (Pawar et al., 2005). Метод основан на построении профиля агрегационных свойств участка полипептидной цепи с учетом факторов, которые предложены авторами ранее для предсказания скорости агрегации (Chiti et al., 2003): гидрофобность рассматриваемого участка, его предрасположенность к образованию α-спирали и β-структуры, а также абсолютная величина суммарного заряда. Эти исследования указывают на то, что образование амилоидной фибриллы не является только основным свойством остова наноамилоида, зависящим от внешних факторов, а это свойство определяется структурой аминокислотных остатков в определенных положениях, составляющих наноамилоид (Chiti et al., 2000).

Нами был предложен новый метод FoldUnfold (Galzitskaya et al., 2006a,б; Галзитская и др., 2006) и FoldAmyloid (Garbuzynskiy et al., 2010) для поиска амилоидогенных участков в белковой цепи, ответственных за образование олигомеров нано-Аβ, которые в процессе самосборки образуют патогенные амилоидные фибриллярные структуры.

Образование достаточного числа контактов между остатками необходимо, чтобы компенсировать потерю конформационной энтропии при сворачивании белка. Тем самым, нативная структура есть результат баланса между конформационной энтропией и энергией взаимодействия между остатками. С учетом этого факта было сделано два предположения. С одной стороны, если средняя плотность окружения (среднее число остатков на заданном расстоянии) меньше, чем «нормальная величина» данного параметра для глобулярных белков, то белок не свернется в нативную структуру, а будет нативно-развернутым. С другой стороны, если средняя плотность окружения больше, чем «нормальная величина» данного параметра для глобулярных белков, то белковой цепи будет выгоднее образовать амилоидную фибриллу (в которой смогут реализоваться все ожидаемые контакты), чем нативную глобулярную структуру. Предполагается, что упаковка внутри фибрилл плотная (так как экспериментально было показано, что амилоидная фибрилла термостабильна, нечувствительна к протеазам и богата β-структурой (Kajava et al., 2004)), поэтому области, которые потенциально могли бы плотно упаковываться (иметь высокую плотность окружения), будут иметь тенденцию образовывать наноамилоиды и амилоидные фибриллы. Данный подход был протестирован (Galzitskaya et al., 2006a,b; Галзитская и др., 2006), в результате чего оказалось, что участки белковой цепи, которые обладают повышенной предполагаемой плотностью окружения, в большинстве случаев являются ответственными за амилоидогенные свойства белков, пептидов и образование наноамилоидов.

Стоит отметить, что на основании полученных экспериментальных данных по амилоидогенным участкам можно выделить два типа амилоидогенных фрагментов, которые ответственны за образование амилоидных фибрилл. Первый тип – амилоидогенный участок обогащен гидрофобными аминокислотами, и фибрилла стабилизируется за счет гидрофобных взаимодействий. Именно этот тип амилоидогенных фрагментов находит уже разработанный нами подход (Galzitskaya et al., 2006a,b). Второй тип – фибрилла стабилизируется водородными связями, образованными боковыми группами аминокислотных остатков. В дальнейшем предполагается развитие данного подхода: поиск амилоидогенных участков второго типа и создание единого метода (и сервера FoldAmyloid) для предсказания амилоидогенных участков обоих типов. Нами сделаны предсказания амилоидогенных участков для ряда белков, для которых положение амилоидогенных участков известно из экспериментальных исследований. Предложенный нами подход дает неплохое согласие с экспериментом (Galzitskaya et al., 2006b; Garbuzynskiy et al., 2010).

Основываясь на теоретических расчетах, были предложены (Massi, Straub, 2001; Thirumalai et al., 2003) несколько сценариев для агрегации нано-Аβ в фибриллярные структуры при БА. Во всех этих сценариях ранним ключевым событием является структурная перестройка постреакционного мономера, вызванная флук-

туациями окружающей среды, воздействием денатуранта или взаимодействием с другими мономерами, которые усиливают агрегационные свойства молекул. Таким образом, совершенно необходимо описать структурные характеристики, которые могут инициировать образование наноамилоидного олигомера при взаимодействии мономерных наноамилоидов. Важно расшифровать, какие изменения в структуре будут усиливать мономерную форму наноамилоида.

Для Аβ-мономеров давно было показано, что остатки с 24 по 27 (VGSN) играют важную роль в локальном упорядочении, хотя считается, что они принимают неупорядоченную структуру (Kirschner et al., 1987). С помощью метода фотометки было показано, что нано-Аβ (1-40) находится в растворе в мономерной, димерной, трехмерной и тетрамерной формах, в то время как для нано-Аβ(1-42) превалирует пентамерная и гептамерная формы (Ban, Goto, 2006). На основании этого можно предположить, что размер критического ядра для образования наноамилоидной формы Аβ будет больше четырех или семи. Только в этом году нами впервые сделаны расчеты числа мономеров, входящих в ядро Аβ-протофибриллы, на основании модели амилоидообразования, разработанной нами (Dovidchenko et al., 2014). В случае Аβ-пептида размер ядра первичной нуклеации составляет 3 мономера, при этом процесс экспоненциального роста происходит по сценарию ветвления, и размер ядра вторичной нуклеации составляет 2 мономера (Dovidchenko et al., 2014).

Для белка Ure2p было найдено, что критическое ядро протофибриллы состоит из шести цепей, варьируя лаг-период амилоидообразования за счет изменения концентрации белка (Fay et al., 2003). Из-за сложности задачи эти данные не были подтверждены теоретическими расчетами. Р. Нельсон и соавторы, используя простые энергетические расчеты, предположили, что минимальное ядро для образования фибриллы пептидом GNNQQNY включает от трех до четырех цепей (Nelson et al., 2005). Расчеты же других авторов показали, что минимальное ядро для этого пептида включает 6 цепей (Tsemekhman et al., 2007). Хотя нужно отметить, что данный расчет не принимает во внимание энтропийные эффекты, которые очень важны для нуклеационных расчетов. Рассмотрение энтропийных эффектов и полноатомное описание модели позволило другим авторам, Р.Д. Хиллу и К.Л. Бруксу, найти критическое ядро для пептида STVIYE, которое оказалось равным пяти мономерам (Hills, Brooks, 2007). Используя эмпирические потенциалы, было показано, что время присоединения нанофрагмента Аβ(16-22) к уже образовавшемуся пентамеру остается все еще большим (Nguyen et al., 2007). Из полноатомного МД-моделирования прионового фрагмента из восьми остатков можно предположить, что восемь цепей является минимальным размером для образования олигомерного β-листа (Ma, Nussinov, 2002).

Для Аβ-пептида было показано, что N-концевой фрагмент 1-19 и С-концевой 35-40 наноамилоида более подвержены водородному обмену как в фибрилле, так и в протофибрилле. Фрагмент 20-34 сильно защищен от обмена в фибрилле и менее в протофибрилле, если предположить, что переход от протофибриллы к фибрилле связан с существенным упорядочением структуры в этом районе (Kheterpal et al., 2006). На основании этих данных можно предположить, что на стадии образования

олигомеров наноамилоидов и протофибрилл можно заблокировать амилоидогенные участки от дальнейшей структурной перестройки.

10. Энергорегулирующие защитные механизмы

Сложные стрессовые ситуации и другие причины, вызывающие в нейроне синтез большого количества белка, в том числе АРР, содержащего около 700 аминокислотных остатков (а.о.), могут угрожать гомеостазу нейрона закритической температурой. Расчеты только по одной молекуле АРР в нормально функционирующем нейроне показали, что при активации одной АК образуется пирофосфат, который в присутствии пирофосфатазы расщепляется на два фосфата, и при этом выделяется большое количество энергии, которая диссипирует в виде тепла. При биосинтезе одного моля АРР в ограниченном пространстве будет выделяться в виде тепловой энергии около 42 000 кДж/моль. Наиболее ранние и грубые патологические изменения метаболизма, а также снижение числа и плотности нейрональных синапсов и нейронов гиппокампа, по мнению ряда авторов (Bertoni-Freddari et al., 1997; Uylings, de Brabander, 2002), может быть объяснено высокими энергетическими процессами в этих областях головного мозга, что в условиях митохондриальной дисфункции из-за развития свободнорадикального окисления и повышенного содержания внутриклеточного Ca^{2+} естественно приводит к ранней гибели нейронов именно этих отделов головного мозга. Было также показано, что тепловая стабильность нуклеопротеинов мозга мышей зависит от возраста и растет по мере старения животного (Greer, Zamenhof, 1962; Kurtz, Sinex, 1967). Для регулирования тепловой стабильности при интенсивном синтезе белка в нейроне должна быть биохимическая защитная система, не допускающая расщепления PPi и диссипации энергии в тепловую. Мы считаем, что эту проблему решают механизмы фосфорилирования транспортных белков АРР и ТБ, которые обеспечивают эвакуацию фосфатов и, вероятно, пирофосфатов из зоны биосинтеза белка на периферию к клеточным мембранам или к митохондриям для дальнейшей утилизации в процессе дефосфорилирования. Хорошо известно, что большинство биохимических процессов, таких как фосфорилирование, ацетилирование и метилирование, обратимы (Шиф, 2005).

11. Тау-белки нейронов

Другим, наиболее активным и эффективным эвакуатором фосфатов и, возможно, пирофосфатов из зоны синтеза белка является ТБ. Белковая молекула ТБ является гидрофильным и высоко асимметричным белком. N-концевой фрагмент ТБ взаимодействует с плазматической мембраной и цитоскелетными белками нейрона, принимает участие в сигнальной трансдукции, определяет расстояние между микротрубочками в аксоне и способен регулировать диаметр последнего (Brandt et al., 1995; Chen et al., 1992).

Данный фрагмент содержит кислую и богатую пролином области в своем составе. Именно богатая пролином область ТБ интенсивно фосфорилирована в мозге пациентов с БА (Johnson, Jenkins, 1999). В составе N-концевого фрагмента ТБ есть небольшие участки связывания железа и гепарина. С-концевой фрагмент ТБ содержит 3 или 4 тубулин-связывающих домена длиной 31–32 остатка каждый (R) и один кислый регион (Alonso et al., 2006) (рис. 3). Установлено, что при активации гепарином GSK3β усиливается фосфорилирование ТБ по сайтам Ser199, Thr231, Ser235, Ser262, Ser396, Ser400, которые характерны для гиперфосфорилированного ТБ при БА (Song, Yang, 1995). Ненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав фосфолипидов, и ионы металлов, особенно алюминий, также стимулируют полимеризацию ТБ (Scott et al., 1993; Wilson, Binder, 1997). В настоящее время рассматривается гипотеза о роли так называемых «воспламеняющих» сайтов фосфорилирования ТБ (Johnson, Bailey, 2002). Речь идет о сайтах, фосфорилирование которых облегчает дальнейшее множественное фосфорилирование молекулы ТБ по аномальным сайтам с образованием гиперфосфорилированного белка. Как правило, «воспламеняющие» сайты в ТБ являются участками взаимодействия с другими внутринейрональными протеинами, и прежде всего тубулином, которому отводится ключевая роль в липид-белковых комплексах возбудимых мембран (Шноль, 1979). Таким образом, тубулин не только входит в состав трубочек, но является одним из компонентов в составе протоплазмы нейрона, определяющих свойства и характеристики фазового перехода возбудимых мембран. К процессам, принимающим участие в посттрансляционной модификации ТБ, относятся фосфорилирование, убиквитирование, гликирование, гликозилирование, окисление, нитрование, агрегация и др. (Cripps et al., 2006; Kuhla et al., 2007). В норме ТБ, взаимодействуя с

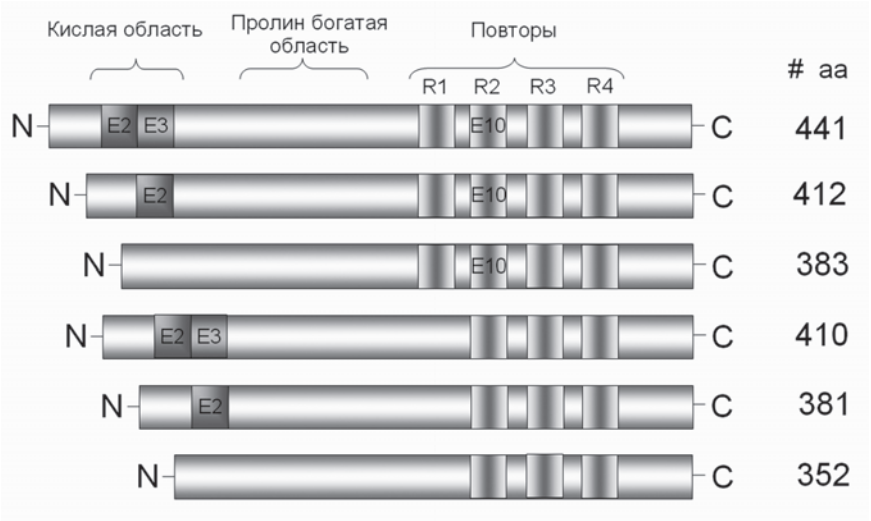


Рис. 3. Схема доменной структуры 6 изоформ тау-белков. E2, E3 и E10 – экзоны N-концевого и С-концевого фрагментов белка

Повторы R1–R4 в молекулах ТБ, содержащие дополнительные сайты, способны связывать фосфаты и АМФ для транспорта из зоны синтеза белка к митохондриям. # aa – число аминокислотных остатков в изоформах ТБ

тубулином, скрепляет и стабилизирует микротрубочки (Biernat et al., 1993), обеспечивает перенос в цитоплазме нейронов клеточных органелл и мобильных биохимических молекул (Probst et al., 2000), регулирует рост аксонов и дендритов (Dawson et al., 2001). Способность ТБ скреплять микротрубочки отчасти объясняется наличием у него нескольких фосфатных групп (см. рис. 3). При интенсивном синтезе белка в нейроне в зоне синтеза белка образуется большое количество молекул пирофосфата и AMP. Пирофосфат может подвергаться гидролизу пирофосфатазой с образованием двух молекул фосфата, а выделяющаяся при этом энергия рассеивается в виде тепла. Молекулы ТБ при участии киназ присоединяют молекулы фосфатов в зоне синтеза белка и способствуют эвакуации этих фосфатов к митохондриям. Возможно, что аналогично осуществляется транспорт молекул AMP из зоны синтеза белка к митохондриям для восстановления в ATP. При продолжительном интенсивном синтезе белка в зоне синтеза температура может повышаться до определенного значения, при котором возникает вероятность присоединения нескольких молекул фосфатов к различным сайтам молекулы ТБ. Аксоногенез также регулируется уровнем фосфорилирования ТБ, при этом образуется градиент степени фосфорилирования молекул ТБ вдоль растущего аксона. Было убедительно показано, что в теле нейрона в основании аксона ТБ фосфорилирован по Ser199/202 и Thr205 на 80%, тогда как в конусе роста аксона только на 20% (Mandell, Banker, 1996). Эти результаты четко свидетельствуют о том, что в центральных зонах нейрона молекулы ТБ полифосфорилируются, а затем, по мере перемещения ТБ от центра нейрона, фосфаты утилизируются. Процесс блокирования пирофосфатов имеет для нейрона важное значение, так как изымает из энергетического обращения энергоемкие молекулы и предотвращает повышение температуры в нейронах. Таким образом, формулу полифосфорилирования ТБ можно записать в виде:

ТБ+nATP ↔ ТБnP+nADP.

В ряде обзоров описаны варианты предотвращения гидролиза пирофосфатов пирофосфатазой в разных организмах (Rao et al., 2009; Da Silva et al., 1991; Terkeltaub, 2001). В нейронах, по нашему мнению, этот процесс протекает следующим образом:

nADP+nPPi ↔ nATP+nPi.

Огромную роль в изучении патогенеза БА занимают исследования генетики ТБ. τ-Ген располагается на 17 хромосоме (17q21 локус) и содержит по крайней мере 16 экзонов (Andreadis et al., 1992; Goedert et al., 1999). В настоящее время для τ-гена выявлен полиморфный динуклеотидный повтор в 9 интроне и 8 одинарных нуклеотидных полиморфизмов (Baker et al., 1999; Rizzu et al., 1999). Первичный эффект интронных мутаций τ-гена, находящихся рядом со сплайс-донорским участком, обусловлен изменением соотношения изоформ ТБ с различным количеством повторов, при этом имеет место преобладание изоформ с 4 повторами (Hong et al., 1998; Ryoo et al., 2007). Была выявлена роль еще одного фермента в гиперфосфорилировании ТБ. Речь идет о тирозин фосфорилирующей регуляторной киназе 1A

с двойной специфичностью (DYRK1A). Ген DYRK1A локализован на той же 21 хромосоме, что и ген APP. С этим ассоциирует наличие интранейрональных нейрофибриллярных сплетений (ИНФС) одновременно с внеклеточными сенильными бляшками агрегированного Аβ при трисомии 21 хромосомы (у пациентов с синдромом Дауна), либо при увеличении копий отдельных генов данной хромосомы (болезнь Альцгеймера) (Grundke-Iqbal et al., 1986; Spires et al., 2006). В мозге человека идентифицировано 6 изоформ ТБ (45–65 кДа) длиной 352–441 а.к. остатков, экспрессирующихся в результате альтернативного мРНК-сплайсинга 2-, 3- и 10-го экзонов (см. рис. 3). Изоформы ТБ отличаются наличием трех (R2, R3, R4) или четырех (R1, R2, R3, R4) повторяющихся участков в С-концевом фрагменте молекулы белка и наличием либо отсутствием одной из двух вставок (Е2 и Е3) в N-концевом фрагменте. Для ТБ характерна биохимическая гетерогенность в различных субпопуляциях нейронов (Buée et al., 2000). Самая длинная изоформа ТБ (441 АК) содержит 80 остатков серина и 5 остатков тирозина, поэтому 20% молекулы потенциально может быть фосфорилировано (Goedert et al., 1989). Изоформы ТБ при разных заболеваниях регистрируются в разных сочетаниях. В частности, при БА идентифицирован триплет ТБ (изоформы тау 55, 64 и 69 кДа), являющийся основной составляющей ИФНС. Все они образуются в результате гиперфосфорилирования. В норме для различных изоформ ТБ выявлены специфические участки фосфорилирования. Однако при БА наблюдается неспецифическое гиперфосфорилирование целого ряда изоформ ТБ по аномальным сайтам (Köpke et al., 1993). Изоформы ТБ с экзоном 10 содержат 2 цистеиновых остатка, без этого экзона – только один. Это предполагает возможность формирования димеров белка за счет образования межмолекулярных дисульфидных связей. Возможно, что окисление сульфгидрильных групп в данном белке может вносить свой вклад в его агрегацию. В нейрофибриллярных сплетениях при БА обнаружены все 6 изоформ гиперфосфорилированного ТБ, которые при электрофоретическом разделении дают 3 основные полосы, соответствующие белкам с молекулярным весом 68, 64 и 60 кДа (Delacourte et al., 1999). Недавно обнаружена изоформа ТБ, представленная в ядре нейронов и других клеток. Она колокализуется с ядерным белком нуклеолином и АТ-богатым участком сателитной ДНК и представлена в конститутивном хроматине. Авторы предполагают, что ядерный ТБ принимает участие в структурировании ядра и гетерохроматинизации отдельных рибосомальных генов (Sjöberg et al., 2006). ТБ может быть фосфорилирован в 30 сайтах, при этом в норме на 1 моль этого белка приходится 2–3 моля фосфатных групп, тогда как у гиперфосфорилированной изоформы – от 5 до 9 молей фосфатов (Alonso et al., 2006; Köpke et al., 1993).

Эти результаты убедительно демонстрируют ситуацию, когда сайты фосфорилирования присоединяют в норме по одному фосфату. В случае высокой интенсивности синтеза эти же сайты могут присоединять несколько фосфатов. Также показано, что N-гликозилирование характерно для гиперфосфорилированного ТБ, тогда как О-гликозилирование – для немодифицированного ТБ (Arnold et al., 1996; Wang et al., 1996). Предполагается, что фосфорилирование и О-гликозилирование этого белка играет роль в его ядерной локализации, а N-гликозилирование гиперфосфорилированного ТБ способствует транспорту этих комплексов к мембране нейрона.

12. Образование нейрофибриллярных сплетений из гиперфосфорилированных тау-белков

При исследовании мозга пациентов, умерших от БА, кроме сенильных бляшек обычно обнаруживают интранейрональные нейрофибриллярные сплетения (ИНФС) (Avila et al., 2004; Johnson, Bailey, 2002). При электронной микроскопии они имеют вид парных спирально скрученных нейрофиламентов в цитоплазме нейронов, которые состоят из гиперфосфориллированных ТБ. При этом один фосфат присоединяется к одной молекуле ТБ, а второй фосфат потенциально готов вступить в реакцию с другой молекулой ТБ. При определенной ситуации другая молекула ТБ присоединяет этот фосфат и образуется димер, соединенный фосфатным мостиком (Rao et al., 2009).

Логичная гипотеза о роли фосфорилирования в формировании ИНФС из ТБ была сформулирована в 2005 г. (Iqbal, Grundke-Iqbal, 2005). В соответствии с представлениями этих авторов, молекулы ТБ образуют гомоагрегаты, в основном посредством доменов, которые взаимодействуют с тубулином микротрубочек (рис. 4).

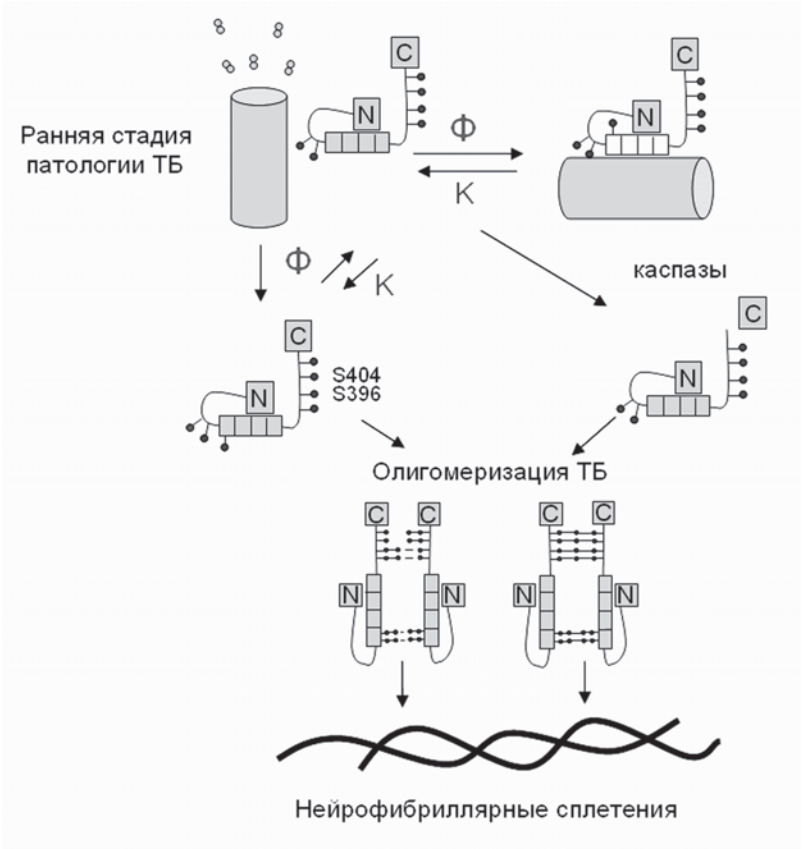


Рис. 4. Схема участия сайт-специфическогогиперфосфорилирования (Ser404 и Ser396) и каспазного расщепления ТБ в процессе агрегации с образованием нейрофибриллярных сплетений

К – киназы, Ф – фосфатазы, N- и C- – концы молекулы ТБ. Цилиндр – микротрубочка

Гиперфосфорилирование ТБ нейтрализует данные домены, облегчая агрегацию и формирование ИНФС. Экспериментально было доказано, что фосфорилирование ТБ по сайтам Thr231 и Ser262 существенно снижает его взаимодействие с тубулином микротрубочек (Biernat et al., 1993; Cripps et al., 2006). Некоторые авторы считают фосфорилирование необходимым, но недостаточным условием для полимеризации ТБ (Chun, Johnson, 2007a,b). Сайт-специфическое фосфорилирование ТБ сопровождается его расщеплением каспазой-3 по сайтам Ser422 и Ser396/404 (Ferrari et al., 2003; Haase et al., 2004). Укороченные и гиперфосфорилированные молекулы этого белка существенно активнее формируют нейрофибриллярные сплетения. Описанное расщепление белка по Glu391 и деамидирование по АК-остаткам аспарагина (или глутамина) также способствуют агрегации (Ding et al., 2006). Токсичность гиперфосфорилированного ТБ, по аналогии с Аβ, ассоциирует с короткими олигомерами и небольшими агрегатами, а не с крупными нейрофиламентами (Spires-Jones et al., 2008). На нейронах мышей было продемонстрировано отсутствие токсического эффекта фАβ в условиях нокаута τ-гена и нейротоксичность псевдофосфорилированного экзогенного ТБ (Fath et al., 2002; Rapoport et al., 2002). По нашему мнению, добавление фАβ в условиях нокаута τ-гена не вызывает коллапса, так как фАβ стимулирует синтез белка в нейронах, у которых нет ТБ, поэтому не происходит гиперфосфорилирования ТБ и последующего коллапса. Убедительно показано, что при избыточной экспрессии ТБ нарушается аксональный транспорт в нейронах. Угнетаются быстрый кинезинзависимый антероградный транспорт в связи с блоком микротрубочек и медленный ретроградный транспорт, поскольку нейрофиламенты тяжелых цепей и ТБ конкурируют за взаимодействие с С-концевым фрагментом тубулина (Ebneth et al., 1998; Probst et al., 2000). ТБ транспортируются в основном медленным аксональным путем, при этом их избыток нарушает связь микротрубочек и нейрофиламентов, приводя к накоплению последних в аксоне. Очень интересные результаты были получены большой группой исследователей на культурах нейронов, нокаутных по ТБ (Tau-/-) и нейронах дикого типа (Tau+/+) (Vossel et al., 2010). Авторы исследовали транспорт митохондрий и TrkA-рецепторов от синапса к телу клетки (ретроградное движение) и от тела клетки к синапсу (антероградное движение). Установлено, что прибавление Аβ «вызывает транспортный коллапс» у Tau+/+ нейронов дикого типа (содержащих ТБ), но не у Tau-/- нейронов, не содержащих ТБ. Авторы не обсуждают, каким образом осуществляется эта связь, если Аβ не участвует в процессах фосфорилирования белков. В данной ситуации добавление Аβ вызывает интенсивный синтез белка в нейронах. Поэтому в нейронах дикого типа ТБ начинают активно фосфорилироваться в зоне синтеза белка и при длительном воздействии Аβ в нейронах начинает развиваться процесс гиперфосфорилирования, а затем транспортный коллапс.

13. Сбой защитных механизмов

Экспериментально показано, что на определенном этапе фосфорилирования ТБ растворимость белковой молекулы уменьшается, возникают зоны «застоя», он

начинает накапливаться в нейроне, нити белка связываются между собой дифосфатными мостиками, «слипаются» в нейрофибриллярные клубки и разрушают транспортную систему нейрона (Hernández, Avila, 2007). Некоторые исследователи считают, что нити гиперфосфорилированного ТБ начинают объединяться между собой путем образования дифосфатных связей, образуя в итоге нейрофибриллярные клубки внутри нервных клеток (Goedert et al., 1991). Все это вызывает дезинтеграцию микротрубочек и коллапс транспортной системы внутри нейрона (Iqbal et al., 2005), приводит к нарушению биохимической передачи сигналов между клетками, а затем и к гибели самих клеток (Chun, Johnson, 2007a). Ненасыщенные жирные кислоты фосфолипидов и ионы металлов, особенно алюминий, также стимулируют полимеризацию ТБ (Scott et al., 1993; Wilson, Binder, 1997). Другие авторы показали, что регуляторная тирозинкиназа 1А (DYRK1A) с двойной специфичностью (Lochhead et al., 2005) катализирует автофосфорилирование по Tyr-321 и фосфорилирует ТБ в положениях Thr212, Ser202 и Ser404 (Korenberg et al., 1994). В модуляции уровня фосфорилирования ТБ *in vivo* кроме киназ принимают участие фосфатазы: а именно PP1, PP2A и PP2B (кальцинеурин) (Korenberg et al., 1994). Оказалось, что PP2A-фосфатаза действует на наибольшее число сайтов фосфорилирования и связывается с участком ТБ, ответственным за взаимодействие с тубулином (Goedert et al., 2000). Экспериментальные исследования условий дезорганизации цитоскелета нейрона выявили развитие гипоксии и оксидативного стресса, которое авторы объясняют тем, что в митохондриях, лишенных бесперебойной «адресной» доставки по микротрубочкам субстратов окисления и кислорода, наблюдается разобщение дыхательной цепи, угнетение синтеза АТР и активация свободнорадикального окисления активными формами кислорода (Лю и др., 2008). Мы полагаем, что это является следствием повышения интенсивности синтеза белка и перегрузкой защитных систем нейрона. Происходит гиперфосфорилирование ТБ, образование между молекул ТБ дифосфатных мостиков и формирование двойных спиральных цепочек, которые заполнили микротрубочки и заблокировали доставку к митохондриям фосфатов, АМР и других компонентов, необходимых для синтеза АТР. Агрегация ТБ *in vitro* с образованием ИНФС была отмечена при их инкубации с мочевиной, неэтерифицированными жирными кислотами, тРНК, гепарином, гепаринсульфатом или полиглутаминовой кислотой (Von Bergen et al., 2001). Нейрофибриллы действительно образуют в мозге пациентов с БА плотные спиральные переплетения с микрофибриллами ТБ, который представляет собой белок, связывающийся с микротрубочками в теле и отростках нейрона. Однако оказалось, что нейрофибриллы ТБ неспецифичны для БА. Они обнаруживаются и при других нейродегенеративных заболеваниях в нейронах различных отделов мозга, в которых ТБ выполняют аналогичные защитные функции. Эти заболевания получили название таупатии. Выпадая в виде нейрофибрилл, ТБ теряет свою функцию и приобретает нейротоксические свойства. Менее изучены сайты фосфорилирования, участвующие в процессах фибриллобразования. Известно, что фосфорилирование Thr231 существенным образом снижает способность ТБ взаимодействовать с тубулином микротрубочек (Cho, Johnson, 2004). Напротив, фосфорилирование по Ser396 и Ser404 оказывает незначительный эффект (Cho, Johnson, 2003). Уровень

ИНФС в нейронах гиппокампа непосредственно коррелирует со степенью выраженности деменции при БА (Alonso et al., 2006). ИНФС присутствуют преимущественно в телах тех нейронов, дегенерирующие аксоны которых находятся в области сенильных бляшек. Основной структурной составляющей нейрофибриллярных сплетений является гиперфосфорилированный ТБ. Интересные данные получены при исследовании взаимосвязи различных метаболических процессов с процессингом Аβ и ТБ. Установлено, что олигомеры нано-Аβ провоцируют нарушение функций циклинзависимой киназы 5 (Cdk5) и изоформы киназы гликогенсинтазы β (GSK3β) (Lund et al., 2001; Takahashi et al., 2003), что вызывает гиперфосфорилирование ТБ и деполимеризацию тубулина микротрубочек (Завалишин, Захарова, 2003). В норме ТБ идентифицированы исключительно в нейронах, в условиях патологии они обнаруживаются также в нейроглии (Johnson, Stoothoff, 2004). В норме для различных изоформ ТБ выявлены специфические участки фосфорилирования. При БА наблюдается неспецифическое гиперфосфорилирование целого ряда изоформ тау по аномальным сайтам (Köpke et al., 1993).

14. Роль фосфорилирования транспортных белков в нейронах

Высокие концентрации фосфатов в зоне синтеза белка в свою очередь способствуют фосфорилированию APP, активации β-секретазы и переключению процессинга APP на амилоидный путь (Walter et al., 1997). Это приводит к образованию дополнительного количества фАβ, которые в свою очередь дополнительно стимулируют синтез APP, возникший «самостимулирующий цикл» замыкается и, как следствие, приводит к неконтролируемому нарастанию количества нано-Аβ (Wallace et al., 1993). Таким образом, механизм фосфорилирования транспортных белков играет в клетке как физиологическую, так и патологическую роль (рис. 5).

В качестве физиологического эффекта важно отметить участие этих белков в эвакуации фосфатов, можно упомянуть стимуляцию роста нейритов (Biernat et al., 2002), регуляцию аксонального транспорта (Spittaels et al., 2000) и управление динамикой сборки и поддержание стабильности микротрубочек (Probst et al., 2000) у нормально фосфорилированного ТБ. Гиперфосфорилирование этого белка по аномальным сайтам приводит к агрегации с образованием токсичных олигомеров (Abraha et al., 2000) и выходом ТБ из микротрубочек с дальнейшей дезорганизацией последних (Lu, Wood, 1993), что в результате способствует блокаде транспортных путей в нейроне, развитию транспортного коллапса и гибели нейрона (Ebneth et al., 1998). Дискуссия относительно первичности роли олигомеров Аβ или ТБ в патогенезе БА привела некоторых исследователей к следующим обобщениям. Генетические предпосылки БА проявляются агрегацией избытка Аβ(1-40) в олигомеры, которые блокируют пресинаптическую мембрану. Это вначале приводит к «молчанию» нейрона и разрыву в сети нейрональной передачи сигнала, а затем токсичный эффект Аβ обусловливает подавление функций митохондрий, мембранных рецепторов, индуцирует развитие оксидативного стресса и разрушение цитоскелета и инициирует гибель нейрона (Лю и др., 2008). В данной гипотезе не

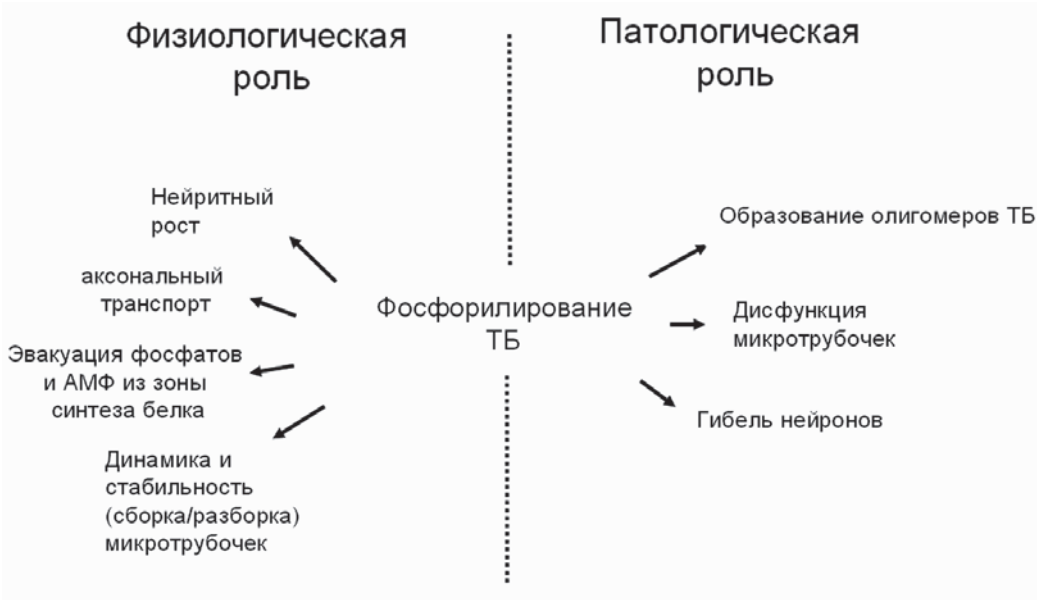


Рис. 5. Физиологическая и патологическая роль фосфорилирования ТБ в нейроне

представлен механизм токсического влияния нано-Аβ на процесс интранейронального гиперфосфорилирования ТБ и его агрегацию. Многие авторы финалом указанных событий считают апоптоз, но при этом никто не описывает классическую картину генетически запрограммированной гибели нейронов. Ранее мы провели сравнительный анализ картин гибели нейронов от некроза, апоптоза и амилоидоза и показали, что по всем важным параметрам они резко отличаются (Maltsev et al., 2011; Каминский и др., 2005).

Любопытно, что при БА и других нейродегенеративных заболеваниях с таупатией в периферической нервной системе исследователи не обнаруживают агрегацию ТБ и объясняют этот феномен присутствием добавочного экзона 4А в молекуле ТБ периферических нейронов, что предотвращает его самоассоциацию (Pérez et al., 2001). Однако другие факты показывают, что причиной отсутствия агрегации ТБ в периферической нервной системе является низкая интенсивность синтеза белка и, следовательно, пониженная активность защитных процессов, связанных с эвакуацией фосфатов. Патологическое фосфорилирование ТБ при БА может быть следствием не только гиперактивности киназ, но и недостаточности фосфатаз (например PP2A). К гипоактивности фосфатаз причастны такие метаболиты, как гомоцистеин, витамин В12, витамин В6 и др. (Vafai, Stock, 2002). Формируясь в нейрофибриллы, ТБ теряет свои физиологические функции и приобретает нейротоксические свойства. В норме «деполимеризация» фибрилл происходит под действием киназ – ферментов, переносящих фосфатные группы от АТР на белки. Фосфорилирование ТБ с помощью фосфатаз приводит к образованию депозитов ТБ, утере белком присущей ему функции, агрегации и нейродегенерации.

15. Заключение

На основании анализа большого блока экспериментальных и клинических исследований мы представили описание начальных этапов физико-биохимических событий в нейронах, которые являются пусковыми факторами развития амилоидоза нейронов и раннего патогенеза БА. Продолжительные стрессовые ситуации и информационное давление на организм сопровождаются интенсивным синтезом белка в нейронах. В зонах активного синтеза белка накапливаются побочные продукты синтеза белка: молекулы AMP и пирофосфатов. Пирофосфаты могут при гидролизе выделять большое количество энергии, которая рассеивается в виде тепловой энергии и может негативно влиять на нейрон. Фосфорилирование постсинтетических молекул APP переключает процессинг APP на амилоидный путь при участии β-секретазы. Эти события вызывают эвакуацию из зоны синтеза белка фосфатов, блокируют гидролиз пирофосфатов и увеличивают концентрацию постреакционных молекул Аβ. ТБ также принимает участие в эвакуации фосфатов и ингибировании гидролиза PPi, доставляя к митохондриям фосфаты, а также другие компоненты, необходимые для синтеза АТФ. При участии шаперонов молекулы Аβ приобретают физиологическую конформацию фАβ, выполняют «свои» присущие им функции и в определенной ситуации индуцируют дополнительный синтез APP в нейроне. В исключительных случаях процесс может выйти из-под контроля: фАβ индуцируют дополнительный синтез APP, как следствие – фосфорилированный APP при процессировании увеличивает количество молекул Аβ. При высокой концентрации фАβ может индуцировать дополнительный синтез APP в соседних нейронах и провоцировать в них развитие аналогичных патологических процессов. При высоких концентрациях фрагментов Аβ часть из них, минуя шапероны, приобретают «дикую» коформацию нано-Аβ. Увеличение продукции молекул Аβ предопределяет процессирование мономерных нано-Аβ, которые негативно воздействуют на синапсы и мембраны нейронов, а также образуют олигомеры нано-Аβ разной архитектуры: фибриллярные, выпадающие в виде фибрилл и бляшек, или округлые. Прогрессирующее поражение синапсов и клеточных мембран вызывает дисфункцию митохондрий (Filosto et al., 2011), ведет к нарушению ионного обмена нейронов, что вызывает генерирование реактивных радикалов и окислов, формирующих оксидативный стресс (Facecchia et al., 2011). При продолжительном отсутствии восстановительного периода покоя в нейроне происходит перегрузка защитных систем, которая вызывает изменения условий эвакуации фосфатов и других метаболитов из зоны синтеза белка. Перегрузка ТБ фосфатами приводит к гиперфосфорилированию ТБ, образованию между молекулами ТБ дифосфатных мостиков (Уверский и др., 1999) и формированию двойных спиральных цепочек, которые заполняют микротрубочки и препятствуют доставку к митохондриям исходных компонентов, необходимых для синтеза ATP. Это дополнительно вызывает дисфункцию митохондрий, липидного и углеводного обмена, образование нейрофибриллярных клубков внутри нервных клеток, коллапс транспортной системы внутри нейрона, а затем и гибель нейронов. Таким образом, причиной гибели нейронов являются вторичные внутринейрональные метаболические изменения.

Подводя итоги можно констатировать, что процесс образования межклеточных бляшек, фибрилл и волокон является приспособительной реакцией организма для сохранения функциональной активности основных рефлекторных процессов при утрате биохимических межнейрональных контактов. Исследование мощной экспериментальной базы позволило выявить значительные изменения нейробиологического каскада в нейронах при начальном развитии амилоидоза нейронов в латентной стадии БА, которые вызывают вторичные внутринейрональные изменения метаболического и структурного характера и демонстрируют мультифакторность патологического процесса. Мы согласны с мнением большинства исследователей, что для определения начальных этапов амилоидоза нейронов и диагностики латентной стадии БА наиболее надежными маркерами являются Аβ (Masliah et al., 1996; Niedowicz et al., 2012) с физиологической конформацией и конформационно модифицированные нано-Аβ, а также гиперфосфорилированный ТБ (Braak, Braak, 1996; Chun, Johnson, 2007b). Успешно разрабатываются биомаркеры для определения ключевых фаз развития патологии БА и контроля эффективности терапии этого заболевания (Hampel et al., 2011).

Наши выводы убедительно показывают, что все вышеописанные процессы протекают параллельно. При этом нейроны максимально используют все защитные ресурсы клетки, чтобы избежать гибели. Полученные результаты предлагают новые подходы к разработке молекулярной диагностики БА и открывают новые перспективы поиска оптимальной патогенетической терапии БА.

Литература

Ашмарин И.Н. Нейрохимия. М.: МГУ, 2001. 463 с.

Белоусов Ю.Б., Медников О.Н., Чикина Е.С. Фармакоэкономические аспекты лечения деменции в РФ // Рус. Мед. Журн. 2005. Т. 13. № 20. С. 1354-1348.

Бехтерева Н.П. Здоровый и больной мозг человека. Л.: Наука, 1988. 262 с.

Гаврилова С.И., Колыхалов И.В., Федорова Я.Ф. и др. Возможности превентивной терапии болезни Альцгеймера: результаты 3-летнего проспективного открытого сравнительного исследования эффективности и безопасности курсовой терапии церебролизином и кавинтоном у пожилых пациентов с синдромом мягкого когнитивного снижения // Журнал неврологии и психиатрии. 2010. Т. 110. № 1. С. 62-69.

Галзитская О.В., Гарбузинский С.А., Лобанов М.Ю. Поиск амилоидогенных участков белковой цепи // Молекулярная биология. 2006. Т. 40. № 5. С. 910-918.

Герасимов Н.П. Двойное слепое плацебо-контролируемое исследование эффективности церебролизина при болезни Альцгеймера // Соц. и клин. психиат. 2000. № 2. С. 35-40.

Гуляева Н.В. Научная конференция «Нейрохимия: фундаментальные и прикладные аспекты». М.: РАН, 2005. С. 163-163.

Ещенко Н.Д. Биохимия психических и нервных болезней. СПб.: СПб ГУ, 2004.

Завалишин И.А., Захарова М.Н. Конформационые болезни: неврологические аспекты: обзор // Журнал неврологии и психиатрии. 2003. № 1. С. 54-60.

Завалишин И.А., Яхно Н.Н., Гаврилова С.И. Нейродегенеративные болезни и старение. Ред. И.А. Завалишин, Н.Н. Яхно, С.И. Гаврилова. М., 2001. С. 242-261.

Каминский Ю.Г., Мальцев А.В., Байрамов В.М. и др. Ферментные и конформационные изменения патогенных белков при амилоидозе в нейроне // Нейрохимия. 2005. Т. 22. № 2. С. 97-101.

Линг Г. Физическая теория живой клетки. Незамеченная революция. СПб., 2008.

Лю Б.Н., Исмаилов С.Б., Лю М.Б. Состояния цитоскелета: связь с «кислородно-перекисными» эффектами в норме, при клеточных патологиях и апоптозе // Биомед. химия. 2008. Т. 54. № 1. С. 58-77.
Мальцев А.В., Галзитская О.В. Образование и участие нано-амилоидов в патогенезе болезни Альцгеймера и других амилоидогенных заболеваний // Биомед. химия. 2010. Т. 56. С. 624-638.
Мальцев А.В., МироноваГ.Д., Байрамов В.М. Официальный бюллетень федеральной службы по интеллектуальной собственности по патентам и товарным знакам «Изобретения, полезные модели». 2008. № 16. Ru.2006141527.A.
Наливаева Н.Н., Беляев Н.Д., Тёрнер А.Дж., Журавин И.А. Роль ферментов метаболизма амилоидного пептида в патогенезе деменции альцгеймеровского типа: поиск методов ранней диагностики и лечения // Психиатрия. 2008. Т. 4. № 6. С. 34-42.
Раевский К.С. Возбуждающие аминокислоты как транслиттеры // Итоги науки и техники ВИНИТИ. Физиология человека и животных. М., 1988. Т. 36.
Рогаев Е.И. Болезнь Альцгеймера и старение: от нейробиологии к терапии. М.: РАМН, 1999. С. 83-86.
Уверский В.Н., Галзитская О.В., Винтер С. и др. Влияние избыточного фосфорилирования на структурные свойства белка ТАУ // Цитология. 1999. Т. 41. С. 540-549.
Четверин А.Б., Спирин А.С. Биоэнергетика и синтез белка // Успехи биол. химии. 1983. Т. 24. С. 3-39.
Шиф М. Метилирование и деметилирование ДНК как мишени противораковой терапии // Биохимия. 2005. Т. 70, № 5. С. 651-669.
Шноль С.Э. Физико-химические факторы биологической эволюции. М.: Наука, 1979. 274 с.
Этинген Л.Е. Нормальная морфология человека старческого возраста. М., 2003. С. 192.
Abraha A., Ghoshal N., Gamblin T.C. et al. C-terminal inhibition of tau assembly in vitro and in Alzheimer's disease // J. Cell Sci. 2000. Vol. 113. Pt. 21. P. 3737-3745.
Alonso A. del C., Li B., Grundke-Iqbal I. et al. Polymerization of hyperphosphorylated tau into filaments eliminates its inhibitory activity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. Vol. 103. P. 8864-8869.
Anderson A.J., Pike C.J., Cotman C.W. Differential induction of immediate early gene proteins in cultured neurons by beta-amyloid (A beta): association of c-Jun with A beta-induced apoptosis // J. Neurochem. 1995. Vol. 65. P. 1487-1498.
Andreadis A., Brown W.M., Kosik K.S. Structure and novel exons of the human tau gene // Biochemistry (Mosc.). 1992. Vol. 31. P. 10626-10633.
Arai H., Lee V.M., Messinger M.L. et al. Expression patterns of beta-amyloid precursor protein (beta-APP) in neural and nonneural human tissues from Alzheimer's disease and control subjects // Ann. Neurol. 1991. Vol. 30. P. 686-693.
Arnold C.S., Johnson G.V., Cole R.N. et al. The microtubule-associated protein tau is extensively modified with O-linked N-acetylglucosamine // J. Biol. Chem. 1996. Vol. 271. P. 28741-28744.
Avila J., Lucas J.J., Perez M. et al. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions // Physiol. Rev. 2004. Vol. 84. P. 361-384.
Baker M., Litvan I., Houlden H. et al. Association of an extended haplotype in the tau gene with progressive supranuclear palsy // Hum. Mol. Genet. 1999. Vol. 8. P. 711-715.
Ban T., Goto Y. Direct observation of amyloid growth monitored by total internal reflection fluorescence microscopy // Methods Enzymol. 2006. Vol. 413. P. 91-102.
Banati R.B., Gehrmann J., Lannes-Vieira J. et al. Inflammatory reaction in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is accompanied by a microglial expression of the beta A4-amyloid precursor protein (APP) // Glia. 1995. Vol. 14. P. 209-215.
Belyaev N.D., Nalivaeva N.N., Makova N.Z. et al. Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease // EMBO Rep. 2009. Vol. 10. P. 94-100.
Bertoni-Freddari C., Fattoretti P., Paoloni R. et al. Impaired dynamic morphology of cerebellar mitochondria in physiological aging and Alzheimer's disease // Ann. NY Acad. Sci. 1997. Vol. 826. P. 479-482.
Bertram L., Hiltunen M., Parkinson M. et al. Family-based association between Alzheimer's disease and variants in UBQLN1 // N. Engl. J. Med. 2005. Vol. 352. P. 884-894.
Biernat J., Gustke N., Drewes G. et al. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding // Neuron. 1993. Vol. 11. P. 153-163.

Biernat J., Wu Y.-Z., Timm T. et al. Protein kinase MARK/PAR-1 is required for neurite outgrowth and establishment of neuronal polarity // Mol. Biol. Cell. 2002. Vol. 13. P. 4013-4028.
Braak H., Braak E. Evolution of the neuropathology of Alzheimer's disease // Acta. Neurol. Scand. Suppl. 1996. Vol. 165. P. 3-12.
Brandt R., Léger J., Lee G. Interaction of tau with the neural plasma membrane mediated by tau's amino-terminal projection domain // J. Cell Biol. 1995. Vol. 131. P. 1327-1340.
Bucciantini M., Calloni G., Chiti F. et al. Prefibrillar amyloid protein aggregates share common features of cytotoxicity // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279. P. 31374-31382.
Buée L., Bussière T., Buée-Scherrer V. et al. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders // Brain Res. Brain Res. Rev. 2000. Vol. 33. P. 95-130.
Chen J., Kanai Y., Cowan N.J. et al. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons // Nature. 1992. Vol. 360. P. 674-677.
Chen Y.R., Huang H.B., Chyan C.L. et al. The effect of Abeta conformation on the metal affinity and aggregation mechanism studied by circular dichroism spectroscopy // J. Biochem. (Tokyo). 2006. Vol. 139. P. 733-740.
Chiti F., Webster P., Taddei N. et al. Designing conditions for in vitro formation of amyloid protofilaments and fibrils // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 3590-3594.
Chiti F., Taddei N., Bucciantini M. et al. Mutational analysis of the propensity for amyloid formation by a globular protein // EMBO J. 2000. Vol. 19. P. 1441-1449.
Chiti F., Stefani M., Taddei N. et al. Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates // Nature. 2003. Vol. 424. P. 805-808.
Cho J.-H., Johnson G.V.W. Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylates tau at both primed and unprimed sites. Differential impact on microtubule binding // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. P. 187-193.
Cho J.-H., Johnson G.V.W. Primed phosphorylation of tau at Thr231 by glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) plays a critical role in regulating tau's ability to bind and stabilize microtubules // J. Neurochem. 2004. Vol. 88. P. 349-358.
Choi B.H., Kim R.C., Vaughan P.J. et al. Decreases in protease nexins in Alzheimer's disease brain // Neurobiol. Aging. 1995. Vol. 16. P. 557-562.
Chun W., Johnson G.V.W. The role of tau phosphorylation and cleavage in neuronal cell death // Front. Biosci. J. Virtual Libr. 2007a. Vol. 12. P. 733-756.
Chun W., Johnson G.V.W. Activation of glycogen synthase kinase 3beta promotes the intermolecular association of tau. The use of fluorescence resonance energy transfer microscopy // J. Biol. Chem. 2007b. Vol. 282. P. 23410-23417.
Cordy J.M., Hussain I., Dingwall C. et al. Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. Vol. 100. P. 11735-11740.
Cribbs D.H., Pike C.J., Weinstein S.L. et al. All-D-enantiomers of beta-amyloid exhibit similar biological properties to all-L-beta-amyloids // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 7431-7436.
Cripps D., Thomas S.N., Jeng Y. et al. Alzheimer disease-specific conformation of hyperphosphorylated paired helical filament-Tau is polyubiquitinated through Lys-48, Lys-11, and Lys-6 ubiquitin conjugation // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281. P. 10825-10838.
Da Silva L.P., Lindahl M., Lundin M. et al. Protein phosphorylation by inorganic pyrophosphate in yeast mitochondria // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1991. Vol. 178. P. 1359-1364.
Dawson H.N., Ferreira A., Eyster M.V. et al. Inhibition of neuronal maturation in primary hippocampal neurons from tau deficient mice // J. Cell Sci. 2001. Vol. 114. P. 1179-1187.
Delacourte A., David J.P., Sergeant N. et al. The biochemical pathway of neurofibrillary degeneration in aging and Alzheimer's disease // Neurology. 1999. Vol. 52. P. 1158-1165.
Deller T., Frotscher M., Nitsch R. Sprouting of crossed entorhinodentate fibers after a unilateral entorhinal lesion: anterograde tracing of fiber reorganization with Phaseolus vulgaris-leucoagglutinin (PHAL) // J. Comp. Neurol. 1996. Vol. 365. P. 42-55.
De Strooper B., Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein // J. Cell Sci. 2000. Vol. 113. Pt. 11. P. 1857-1870.
De Strooper B., Annaert W. Presenilins and the intramembrane proteolysis of proteins: facts and fiction // Nat. Cell Biol. 2001. Vol. 3. P. E221-225.

Ding H., Matthews T.A., Johnson G.V.W. Site-specific phosphorylation and caspase cleavage differentially impact tau-microtubule interactions and tau aggregation // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281. P. 19107-19114.
Dobson C.M. Protein misfolding, evolution and disease // Trends Biochem. Sci. 1999. Vol. 24. P. 329-332.
Dovidchenko N.V., Finkelstein A.V., Galzitskaya O.V. How to determine the size of folding nuclei of protofibrils from the concentration dependence of the rate and lag-time of aggregation? I. Modeling the amyloid protofibril formation // J. Phys. Chem. 2014. in press.
Ebneth A., Godemann R., Stamer K. et al. Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer's disease // J. Cell Biol. 1998. Vol. 143. P. 777-794.
Esteras-Chopo A., Serrano L., López de la Paz M. The amyloid stretch hypothesis: recruiting proteins toward the dark side // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. Vol. 102. P. 16672-16677.
Facecchia K., Fochesato L.-A., Ray S.D. et al. Oxidative toxicity in neurodegenerative diseases: role of mitochondrial dysfunction and therapeutic strategies // J. Toxicol. 2011. Vol. 2011. P. 683-728.
Fändrich M., Fletcher M.A., Dobson C.M. Amyloid fibrils from muscle myoglobin // Nature. 2001. Vol. 410. P. 165-166.
Fardilha M., Vieira S.I., Barros A. et al. Differential distribution of Alzheimer's amyloid precursor protein family variants in human sperm // Ann. NY Acad. Sci. 2007. Vol. 1096. P. 196-206.
Fath T., Eidenmüller J., Brandt R. Tau-mediated cytotoxicity in a pseudohyperphosphorylation model of Alzheimer's disease // J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 2002. Vol. 22. P. 9733-9741.
Fay N., Inoue Y., Bousset L. et al. Assembly of the yeast prion Ure2p into protein fibrils. Thermodynamic and kinetic characterization // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. P. 30199-30205.
Ferrari A., Hoerndli F., Baechi T. et al. Beta-amyloid induces paired helical filament-like tau filaments in tissue culture // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. P. 40162-40168.
Figueiredo-Pereira M.E., Efthimiopoulos S., Tezapsidis N. et al. Distinct secretases, a cysteine protease and a serine protease, generate the C termini of amyloid beta-proteins Abeta1-40 and Abeta1-42, respectively // J. Neurochem. 1999. Vol. 72. P. 1417-1422.
Filosto M., Scarpelli M., Cotelli M.S. et al. The role of mitochondria in neurodegenerative diseases // J. Neurol. 2011. Vol. 258. P. 1763-1774.
Fisher G.H., Petrucelli L., Gardner C. et al. Free D-amino acids in human cerebrospinal fluid of Alzheimer disease, multiple sclerosis, and healthy control subjects // Mol. Chem. Neuropathol. Spons. Int. Soc. Neurochem. World Fed. Neurol. Res. Groups Neurochem. Cerebrospinal Fluid. 1994. Vol. 23. P. 115-124.
Furukawa K., Sopher B.L., Rydel R.E. et al. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain // J. Neurochem. 1996. Vol. 67. P. 1882-1896.
Galzitskaya O.V., Garbuzynskiy S.O., Lobanov M.Y. Is it possible to predict amyloidogenic regions from sequence alone? // J. Bioinform. Comput. Biol. 2006a. Vol. 4. P. 373-388.
Galzitskaya O.V., Garbuzynskiy S.O., Lobanov M.Y. Prediction of amyloidogenic and disordered regions in protein chains // PLoS Comput. Biol. 2006b. Vol. 2. P. e177.
Garbuzynskiy S.O., Lobanov M.Y., Galzitskaya O.V. FoldAmyloid: a method of prediction of amyloidogenic regions from protein sequence // Bioinformatics. 2010. Vol. 26. P. 326-332.
Gelfanova V., Higgs R.E., Dean R.A. et al. Quantitative analysis of amyloid-beta peptides in cerebrospinal fluid using immunoprecipitation and MALDI-Tof mass spectrometry // Brief. Funct. Genomic. Proteomic. 2007. Vol. 6. P. 149-158.
Geula C., Mesulam M.M. Cholinesterases and the pathology of Alzheimer disease // Alzheimer Dis. Assoc. Disord. 1995. Vol. 9. Suppl. 2. P. 23-28.
Gevaert K., Goethals M., Martens L. et al. Exploring proteomes and analyzing protein processing by mass spectrometric identification of sorted N-terminal peptides // Nat. Biotechnol. 2003. Vol. 21. P. 566-569.
Ghiso J., Shayo M., Calero M. et al. Systemic catabolism of Alzheimer's Abeta40 and Abeta42 // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279. P. 45897-45908.
Giasson B.I., Lee V.M.-Y., Trojanowski J.Q. Interactions of amyloidogenic proteins // Neuromolecular Med. 2003. Vol. 4. P. 49-58.
Goedert M., Spillantini M.G., Jakes R. et al. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease // Neuron. 1989. Vol. 3. P. 519-526.

Goedert M., Spillantini M.G., Crowther R.A. Tau proteins and neurofibrillary degeneration // Brain Pathol. Zurich Switz. 1991. Vol. 1. P. 279-286.
Goedert M., Spillantini M.G., Crowther R.A. et al. Tau gene mutation in familial progressive subcortical gliosis // Nat. Med. 1999. Vol. 5. P. 454-457.
Goedert M., Satumtira S., Jakes R. et al. Reduced binding of protein phosphatase 2A to tau protein with frontotemporal dementia and parkinsonism linked to chromosome 17 mutations // J. Neurochem. 2000. Vol. 75. P. 2155-2162.
Greer S., Zamenhof S. Studies on depurination of DNA by heat // J. Mol. Biol. 1962. Vol. 4. P. 123-141.
Grundke-Iqbal I., Iqbal K., Tung Y.C. et al. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 83. P. 4913-4917.
Haase C., Stieler J.T., Arendt T. et al. Pseudophosphorylation of tau protein alters its ability for self-aggregation // J. Neurochem. 2004. Vol. 88. P. 1509-1520.
Hampel H., Wilcock G., Andrieu S. et al. Biomarkers for Alzheimer's disease therapeutic trials // Prog. Neurobiol. 2011. Vol. 95. P. 579-593.
Hardy J., Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease // Trends Pharmacol. Sci. 1991. Vol. 12. P. 383-388.
Hardy J., Selkoe D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics // Science. 2002. Vol. 297. P. 353-356.
Hernández F., Avila J. Tauopathies // Cell. Mol. Life Sci. CMLS. 2007. Vol. 64. P. 2219-2233.
Hills R.D. Jr, Brooks C.L. 3rd. Hydrophobic cooperativity as a mechanism for amyloid nucleation // J. Mol. Biol. 2007. Vol. 368. P. 894-901.
Hong M., Zhukareva V., Vogelsberg-Ragaglia V. et al. Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17 // Science. 1998. Vol. 282. P. 1914-1917.
Hoyer S. Brain glucose and energy metabolism abnormalities in sporadic Alzheimer disease. Causes and consequences: an update // Exp. Gerontol. 2000. Vol. 35. P. 1363-1372.
Ibba M., Soll D. Aminoacyl-tRNA synthesis // Annu. Rev. Biochem. 2000. Vol. 69. P. 617-650.
Iqbal K., Grundke-Iqbal I. Metabolic/signal transduction hypothesis of Alzheimer's disease and other tauopathies // Acta. Neuropathol. (Berl.). 2005. Vol. 109. P. 25-31.
Iqbal K., Alonso A. del C., Chen S. et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies // Biochim. Biophys. Acta. 2005. Vol. 1739. P. 198-210.
Ivanova M.I., Sawaya M.R., Gingery M. et al. An amyloid-forming segment of beta2-microglobulin suggests a molecular model for the fibril // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101. P. 10584-10589.
Iwata A., Chen X.-H., McIntosh T.K. et al. Long-term accumulation of amyloid-beta in axons following brain trauma without persistent upregulation of amyloid precursor protein genes // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2002. Vol. 61. P. 1056-1068.
Johansson J. Membrane properties and amyloid fibril formation of lung surfactant protein C // Biochem. Soc. Trans. 2001. Vol. 29. P. 601-606.
Johnson G.V.W., Bailey C.D.C. Tau, where are we now? // J. Alzheimers Dis. JAD. 2002. Vol. 4. P. 375-398.
Johnson G.V., Jenkins S.M. Tau protein in normal and Alzheimer's disease brain // J. Alzheimers Dis. JAD. 1999. Vol. 1. P. 307-328.
Johnson G.V.W., Stoothoff W.H. Tau phosphorylation in neuronal cell function and dysfunction // J. Cell Sci. 2004. Vol. 117. P. 5721-5729.
Kajava A.V., Baxa U., Wickner R.B. et al. A model for Ure2p prion filaments and other amyloids: the parallel superpleated beta-structure // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101. P. 7885-7890.
Kaneko I., Yamada N., Sakuraba Y. et al. Suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase, a primary target of beta-amyloid, and its derivative racemized at Ser residue // J. Neurochem. 1995. Vol. 65. P. 2585-2593.
Kang J., Lemaire H.G., Unterbeck A. et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor // Nature. 1987. Vol. 325. P. 733-736.
Kayed R., Head E., Thompson J.L. et al. Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis // Science. 2003. Vol. 300. P. 486-489.
Kheterpal I., Chen M., Cook K.D. et al. Structural differences in Abeta amyloid protofibrils and fibrils mapped by hydrogen exchange--mass spectrometry with on-line proteolytic fragmentation // J. Mol. Biol. 2006. Vol. 361. P. 785-795.

Kirschner D.A., Inouye H., Duffy L.K. et al. Synthetic peptide homologous to beta protein from Alzheimer disease forms amyloid-like fibrils in vitro // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. Vol. 84. P. 6953-6957.

König G., Mönning U., Czech C. et al. Identification and differential expression of a novel alternative splice isoform of the beta A4 amyloid precursor protein (APP) mRNA in leukocytes and brain microglial cells // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267. P. 10804-10809.

Köpke E., Tung Y.C., Shaikh S. et al. Microtubule-associated protein tau. Abnormal phosphorylation of a non-paired helical filament pool in Alzheimer disease // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 268. P. 24374-24384.

Korenberg J.R., Chen X.N., Schipper R. et al. Down syndrome phenotypes: the consequences of chromosomal imbalance // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91. P. 4997-5001.

Ksiezak-Reding H., Tracz E., Yang L.S. et al. Ultrastructural instability of paired helical filaments from corticobasal degeneration as examined by scanning transmission electron microscopy // Am. J. Pathol. 1996. Vol. 149. P. 639-651.

Kubo T., Nishimura S., Kumagae Y. et al. In vivo conversion of racemized beta-amyloid ([D-Ser 26]A beta 1-40) to truncated and toxic fragments ([D-Ser 26]A beta 25-35/40) and fragment presence in the brains of Alzheimer's patients // J. Neurosci. Res. 2002. Vol. 70. P. 474-483.

Kubo T., Kumagae Y., Miller C.A. et al. Beta-amyloid racemized at the Ser26 residue in the brains of patients with Alzheimer disease: implications in the pathogenesis of Alzheimer disease // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2003. Vol. 62. P. 248-259.

Kuhla B., Haase C., Flach K. et al. Effect of pseudophosphorylation and cross-linking by lipid peroxidation and advanced glycation end product precursors on tau aggregation and filament formation // J. Biol. Chem. 2007. Vol. 282. P. 6984-6991.

Kurtz D.I., Sinex F.M. Age related differences in the association of brain DNA and nuclear protein // Biochim. Biophys. Acta. 1967. Vol. 145. P. 840-842.

Lannfelt L., Basun H., Vigo-Pelfrey C. et al. Amyloid beta-peptide in cerebrospinal fluid in individuals with the Swedish Alzheimer amyloid precursor protein mutation // Neurosci. Lett. 1995. Vol. 199. P. 203-206.

Lanz T.A., Karmilowicz M.J., Wood K.M. et al. Concentration-dependent modulation of amyloid-beta in vivo and in vitro using the gamma-secretase inhibitor, LY-450139 // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2006. Vol. 319. P. 924-933.

Lehtimäki T., Pirttilä T., Mehta P. et al. Apolipoprotein E (apoE) polymorphism and its influence on ApoE concentrations in the cerebrospinal fluid in Finnish patients with Alzheimer's disease // Hum. Genet. 1995. Vol. 95. P. 39-42.

Li W.-Z., Li W.-P., Huang D.-K. et al. Dexamethasone and Aβ25-35 accelerate learning and memory impairments due to elevate amyloid precursor protein expression and neuronal apoptosis in 12-month male rats // Behav. Brain Res. 2012. Vol. 227. P. 142-149.

Liu T., Qian W.-J., Gritsenko M.A. et al. Human plasma N-glycoproteome analysis by immunoaffinity subtraction, hydrazide chemistry, and mass spectrometry // J. Proteome Res. 2005. Vol. 4. P. 2070-2080.

Lochhead P.A., Sibbet G., Morrice N. et al. Activation-loop autophosphorylation is mediated by a novel transitional intermediate form of DYRKs // Cell. 2005. Vol. 121. P. 925-936.

Louw C., Gordon A., Johnston N. et al. Arginine deiminases: therapeutic tools in the etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease // J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 2007. Vol. 22. P. 121-126.

Low L.-F., Anstey K.J. Dementia literacy: Recognition and beliefs on dementia of the Australian public // Alzheimers Dement. 2009. Vol. 5. P. 43-49.

Lu Q., Wood J.G. Functional studies of Alzheimer's disease tau protein // J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 1993. Vol. 13. P. 508-515.

Lu J., Miao J., Su T., Liu Y., He R. Formaldehyde induces hyperphosphorylation and polymerization of Tau protein both in vitro and *in vivo* // Biochim. Biophys. Acta. 2013. Vol. 1830. P. 4102-4116.

Lund E.T., McKenna R., Evans D.B. et al. Characterization of the in vitro phosphorylation of human tau by tau protein kinase II (cdk5/p20) using mass spectrometry // J. Neurochem. 2001. Vol. 76. P. 1221-1232.

Ma B., Nussinov R. Molecular dynamics simulations of alanine rich beta-sheet oligomers: Insight into amyloid formation // Protein Sci. Publ. Protein Soc. 2002. Vol. 11. P. 2335-2350.

Ma Q.-F., Hu J., Wu W.-H. et al. Characterization of copper binding to the peptide amyloid-beta(1-16) associated with Alzheimer's disease // Biopolymers. 2006. Vol. 83. P. 20-31.

Ma S.L., Pastorino L., Zhou X.Z. et al. Prolyl isomerase Pin1 promotes amyloid precursor protein (APP) turnover by inhibiting glycogen synthase kinase-3β (GSK3β) activity: novel mechanism for Pin1 to protect against Alzheimer disease // J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287. P. 6969-6973.

Maat-Schieman M.L., Rozemuller A.J., van Duinen S.G. et al. Microglia in diffuse plaques in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis (Dutch). An immunohistochemical study // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1994. Vol. 53. P. 483-491.

Maddalena A.S., Papassotiropoulos A., Gonzalez-Agosti C. et al. Cerebrospinal fluid profile of amyloid beta peptides in patients with Alzheimer's disease determined by protein biochip technology // Neurodegener. Dis. 2004. Vol. 1. P. 231-235.

Maltsev A.V., Bystryak S., Galzitskaya O.V. The role of β-amyloid peptide in neurodegenerative diseases // Ageing Res. Rev. 2011. Vol. 10. P. 440-452.

Mandell J.W., Banker G.A. A spatial gradient of tau protein phosphorylation in nascent axons // J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 1996. Vol. 16. P. 5727-5740.

Masliah E., Sisk A., Mallory M. et al. Comparison of neurodegenerative pathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein and Alzheimer's disease // J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 1996. Vol. 16. P. 5795-5811.

Massi F., Straub J.E. Energy landscape theory for Alzheimer's amyloid beta-peptide fibril elongation // Proteins. 2001. Vol. 42. P. 217-229.

Mattson M.P. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives // Physiol. Rev. 1997. Vol. 77. P. 1081-1132.

McRae A., Ling E.A., Polinsky R. et al. Antibodies in the cerebrospinal fluid of some Alzheimer's disease patients recognize amoeboid microglial cells in the developing rat central nervous system // Neuroscience. 1991. Vol. 41. P. 739-752.

Meek P.D., McKeithan K., Schumock G.T. Economic considerations in Alzheimer's disease // Pharmacotherapy. 1998. Vol. 18. P. 68-73; discussion 79-82.

Minicozzi V., Stellato F., Comai M. et al. Identifying the minimal copper- and zinc-binding site sequence in amyloid-beta peptides // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283. P. 10784-10792.

Mita S., Sadlock J., Herbert J. et al. A cDNA specifying the human amyloid beta precursor protein (ABPP) encodes a 95-kDa polypeptide // Nucleic Acids Res. 1988. Vol. 16. P. 9351.

Molinari M., Eriksson K.K., Calanca V. et al. Contrasting functions of calreticulin and calnexin in glycoprotein folding and ER quality control // Mol. Cell. 2004. Vol. 13. P. 125-135.

Mori H., Hosoda K., Matsubara E. et al. Tau in cerebrospinal fluids: establishment of the sandwich ELISA with antibody specific to the repeat sequence in tau // Neurosci. Lett. 1995. Vol. 186. P. 181-183.

Moya K.L., Benowitz L.I., Schneider G.E. et al. The amyloid precursor protein is developmentally regulated and correlated with synaptogenesis // Dev. Biol. 1994. Vol. 161. P. 597-603.

Mucke L., Abraham C.R., Masliah E. Neurotrophic and neuroprotective effects of hAPP in transgenic mice // Ann. NY Acad. Sci. 1996. Vol. 777. P. 82-88.

Mudher A., Lovestone S. Alzheimer's disease-do tauists and baptists finally shake hands? // Trends Neurosci. 2002. Vol. 25. P. 22-26.

Musunuri S., Wetterhall M., Ingelsson M. et al. Quantification of the brain proteome in Alzheimer's disease using multiplexed mass spectrometry // J. Proteome Res. 2014. Vol. 13. P. 2056-2068.

Nalivaeva N.N., Fisk L.R., Belyaev N.D. et al. Amyloid-degrading enzymes as therapeutic targets in Alzheimer's disease // Curr. Alzheimer Res. 2008. Vol. 5. P. 212-224.

Narayan P., Meehan S., Carver J.A. et al. Amyloid-β oligomers are sequestered by both intracellular and extracellular chaperones // Biochemistry (Mosc.). 2012. Vol. 51. P. 9270-9276.

Nelson R., Sawaya M.R., Balbirnie M. et al. Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils // Nature. 2005. Vol. 435. P. 773-778.

Nguyen P.H., Li M.S., Stock G. et al. Monomer adds to preformed structured oligomers of Abeta-peptides by a two-stage dock-lock mechanism // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. Vol. 104. P. 111-116.

Niedowicz D.M., Beckett T.L., Matveev S. et al. Pittsburgh compound B and the postmortem diagnosis of Alzheimer disease // Ann. Neurol. 2012. Vol. 72. P. 564-570.

Nilsson M.R. Techniques to study amyloid fibril formation in vitro // Methods San Diego Calif. 2004. Vol. 34. P. 151-160.

Pardossi-Piquard R., Petit A., Kawarai T. et al. Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP // Neuron. 2005. Vol. 46. P. 541-554.

Pawar A.P., Dubay K.F., Zurdo J. et al. Prediction of «aggregation-prone» and «aggregation-susceptible» regions in proteins associated with neurodegenerative diseases // J. Mol. Biol. 2005. Vol. 350. P. 379-392.
Pérez M., Arrasate M., Montejo De Garcini E. et al. In vitro assembly of tau protein: mapping the regions involved in filament formation // Biochemistry (Mosc.). 2001. Vol. 40. P. 5983-5991.
Perlick D., Mattis S. Neuropsychological assessment in chronic care settings: potential utility and special considerations for evaluating dementia in the elderly // Alzheimer Dis. Assoc. Disord. 1994. Vol. 8. Suppl 1. P. S209-213.
Priller C., Bauer T., Mitteregger G. et al. Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein // J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 2006. Vol. 26. P. 7212-7221.
Probst A., Götz J., Wiederhold K.H. et al. Axonopathy and amyotrophy in mice transgenic for human four-repeat tau protein // Acta Neuropathol. (Berl.). 2000. Vol. 99. P. 469-481.
Prusiner S.B. Molecular biology of prions causing infectious and genetic encephalopathies of humans as well as scrapie of sheep and BSE of cattle // Dev. Biol. Stand. 1991. Vol. 75. P. 55-74.
Prusiner S.B. Molecular biology and genetics of prion diseases // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1994. Vol. 343. P. 447-463.
Prusiner S.B. Prion diseases and the BSE crisis // Science. 1997. Vol. 278. P. 245-251.
Rao N.N., Gómez-García M.R., Kornberg A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival // Annu. Rev. Biochem. 2009. Vol. 78. P. 605-647.
Rapoport M., Dawson H.N., Binder L.I. et al. Tau is essential to beta -amyloid-induced neurotoxicity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99. P. 6364-6369.
Rizzu P., Van Swieten J.C., Joosse M. et al. High prevalence of mutations in the microtubule-associated protein tau in a population study of frontotemporal dementia in the Netherlands // Am. J. Hum. Genet. 1999. Vol. 64. P. 414-421.
Roch J.M., Masliah E., Roch-Levecq A.C. et al. Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91. P. 7450-7454.
Rochet J.C., Lansbury P.T. Jr. Amyloid fibrillogenesis: themes and variations // Curr. Opin. Struct. Biol. 2000. Vol. 10. P. 60-68.
Roher A.E., Lowenson J.D., Clarke S. et al. beta-Amyloid-(1-42) is a major component of cerebrovascular amyloid deposits: implications for the pathology of Alzheimer disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. Vol. 90. P. 10836-10840.
Ryoo S.-R., Jeong H.K., Radnaabazar C. et al. DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of Tau. A functional link between Down syndrome and Alzheimer disease // J. Biol. Chem. 2007. Vol. 282. P. 34850-34857.
Salloway S., Mintzer J., Weiner M.F. et al. Disease-modifying therapies in Alzheimer's disease // Alzheimers Dement. 2008. Vol. 4. P. 65-79.
Scott C.W., Fieles A., Sygowski L.A. et al. Aggregation of tau protein by aluminum // Brain Res. 1993. Vol. 628. P. 77-84.
Shapira R., Austin G.E., Mirra S.S. Neuritic plaque amyloid in Alzheimer's disease is highly racemized // J. Neurochem. 1988. Vol. 50. P. 69-74.
Shoji M., Golde T.E., Ghiso J. et al. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing // Science. 1992. Vol. 258. P. 126-129.
Singh N., Talalayeva Y., Tsiper M. et al. The role of Alzheimer's disease-related presenilin 1 in intercellular adhesion // Exp. Cell Res. 2001. Vol. 263. P. 1-13.
Sjöberg M.K., Shestakova E., Mansuroglu Z. et al. Tau protein binds to pericentromeric DNA: a putative role for nuclear tau in nucleolar organization // J. Cell Sci. 2006. Vol. 119. P. 2025-2034.
Smith D.H., Chen X.-H., Iwata A. et al. Amyloid beta accumulation in axons after traumatic brain injury in humans // J. Neurosurg. 2003. Vol. 98. P. 1072-1077.
Smyth M.D., Cribbs D.H., Tenner A.J. et al. Decreased levels of C1q in cerebrospinal fluid of living Alzheimer patients correlate with disease state // Neurobiol. Aging. 1994. Vol. 15. P. 609-614.
Song J.S., Yang S.D. Tau protein kinase I/GSK-3 beta/kinase FA in heparin phosphorylates tau on Ser199, Thr231, Ser235, Ser262, Ser369, and Ser400 sites phosphorylated in Alzheimer disease brain // J. Protein Chem. 1995. Vol. 14. P. 95-105.
Southwick P.C., Yamagata S.K., Echols C.L. Jr. et al. Assessment of amyloid beta protein in cerebrospinal fluid as an aid in the diagnosis of Alzheimer's disease // J. Neurochem. 1996. Vol. 66. P. 259-265.

Spires T.L., Orne J.D., SantaCruz K. et al. Region-specific dissociation of neuronal loss and neurofibrillary pathology in a mouse model of tauopathy // Am. J. Pathol. 2006. Vol. 168. P. 1598-1607.

Spires-Jones T.L., de Calignon A., Matsui T. et al. In vivo imaging reveals dissociation between caspase activation and acute neuronal death in tangle-bearing neurons // J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci. 2008. Vol. 28. P. 862-867.

Spittaels K., Van den Haute C., Van Dorpe J. et al. Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates protein tau and rescues the axonopathy in the central nervous system of human four-repeat tau transgenic mice // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 41340-41349.

Sprecher C.A., Grant F.J., Grimm G. et al. Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family // Biochemistry (Mosc.). 1993. Vol. 32. P. 4481-4486.

Stanton L.R., Coetzee R.H. Down's syndrome and dementia // Adv. Psychiatr. Treat. 2004. Vol. 10. P. 50-58.

Steiner H., Fluhrer R., Haass C. Intramembrane proteolysis by gamma-secretase // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283. P. 29627-29631.

Stone J.R., Okonkwo D.O., Singleton R.H. et al. Caspase-3-mediated cleavage of amyloid precursor protein and formation of amyloid Beta peptide in traumatic axonal injury // J. Neurotrauma. 2002. Vol. 19. P. 601-614.

Takahashi S., Saito T., Hisanaga S. et al. Tau phosphorylation by cyclin-dependent kinase 5/p39 during brain development reduces its affinity for microtubules // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. P. 10506-10515.

Talmard C., Leuma Yona R., Faller P. Mechanism of zinc(II)-promoted amyloid formation: zinc(II) binding facilitates the transition from the partially alpha-helical conformer to aggregates of amyloid beta protein(1-28) // J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem. 2009. Vol. 14. P. 449-455.

Tanaka S., Shiojiri S., Takahashi Y. et al. Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989. Vol. 165. P. 1406-1414.

Tarr P.E., Roncarati R., Pelicci G. et al. Tyrosine phosphorylation of the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic tail promotes interaction with Shc // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. P. 16798-16804.

Tenidis K., Waldner M., Bernhagen J. et al. Identification of a penta- and hexapeptide of islet amyloid polypeptide (IAPP) with amyloidogenic and cytotoxic properties // J. Mol. Biol. 2000. Vol. 295. P. 1055-1071.

Terkeltaub R.A. Inorganic pyrophosphate generation and disposition in pathophysiology // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2001. Vol. 281. P. C1-C11.

Thal D.R., Glas A., Schneider W. et al. Differential pattern of beta-amyloid, amyloid precursor protein and apolipoprotein E expression in cortical senile plaques // Acta. Neuropathol. (Berl.). 1997. Vol. 94. P. 255-265.

Thirumalai D., Klimov D.K., Dima R.I. Emerging ideas on the molecular basis of protein and peptide aggregation // Curr. Opin. Struct. Biol. 2003. Vol. 13. P. 146-159.

Tsemekhman K., Goldschmidt L., Eisenberg D. et al. Cooperative hydrogen bonding in amyloid formation // Protein Sci. Publ. Protein Soc. 2007. Vol. 16. P. 761-764.

Turner P.R., O'Connor K., Tate W.P. et al. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory // Prog. Neurobiol. 2003. Vol. 70. P. 1-32.

Turner P.R., Bourne K., Garama D. et al. Production, purification and functional validation of human secreted amyloid precursor proteins for use as neuropharmacological reagents // J. Neurosci. Methods. 2007. Vol. 164. P. 68-74.

Uversky V.N., Gillespie J.R., Fink A.L. Why are «natively unfolded» proteins unstructured under physiologic conditions? // Proteins. 2000. Vol. 41. P. 415-427.

Uylings H.B.M., de Brabander J.M. Neuronal changes in normal human aging and Alzheimer's disease // Brain Cogn. 2002. Vol. 49. P. 268-276.

Vafai S.B., Stock J.B. Protein phosphatase 2A methylation: a link between elevated plasma homocysteine and Alzheimer's Disease // FEBS Lett. 2002. Vol. 518. P. 1-4.

Van Nostrand W.E., Cunningham D.D. Purification of protease nexin II from human fibroblasts // J. Biol. Chem. 1987. Vol. 262. P. 8508-8514.

Vigo-Pelfrey C., Lee D., Keim P. et al. Characterization of beta-amyloid peptide from human cerebrospinal fluid // J. Neurochem. 1993. Vol. 61. P. 1965-1968.

Von Bergen M., Friedhoff P., Biernat J. et al. Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 5129-5134.

Von Bergen M., Barghorn S., Li L. et al. Mutations of tau protein in frontotemporal dementia promote aggregation of paired helical filaments by enhancing local beta-structure // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 48165-48174.

Vossel K.A., Zhang K., Brodbeck J. et al. Tau reduction prevents Abeta-induced defects in axonal transport // Science. 2010. Vol. 330. P. 198.

Wakasugi K., Schimmel P. Highly differentiated motifs responsible for two cytokine activities of a split human tRNA synthetase // J. Biol. Chem. 1999a. Vol. 274. P. 23155-23159.

Wakasugi K., Schimmel P. Two distinct cytokines released from a human aminoacyl-tRNA synthetase // Science. 1999b. Vol. 284. P. 147-151.

Wall J.S., Richey T., Stuckey A. et al. In vivo molecular imaging of peripheral amyloidosis using heparin-binding peptides // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. Vol. 108. P. E586-594.

Wallace W., Ahlers S.T., Gotlib J. et al. Amyloid precursor protein in the cerebral cortex is rapidly and persistently induced by loss of subcortical innervation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. Vol. 90. P. 8712-8716.

Walter J., Capell A., Hung A.Y. et al. Ectodomain phosphorylation of beta-amyloid precursor protein at two distinct cellular locations // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 1896-1903.

Wang J.Z., Grundke-Iqbal I., Iqbal K. Glycosylation of microtubule-associated protein tau: an abnormal posttranslational modification in Alzheimer's disease // Nat. Med. 1996. Vol. 2. P. 871-875.

Wasco W., Bupp K., Magendantz M. et al. Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1992. Vol. 89. P. 10758-10762.

Wasco W., Gurubhagavatula S., Paradis M.D. et al. Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor // Nat. Genet. 1993. Vol. 5. P. 95-100.

Wilkinson D. Drugs for treatment of Alzheimer's disease // Int. J. Clin. Pract. 2001. Vol. 55. P. 129-134.

Williams K., Pye V., Saunders A. et al. Apolipoprotein E uptake and low-density lipoprotein receptor-related protein expression by the NTera2/D1 cell line: a cell culture model of relevance for late-onset Alzheimer's disease // Neurobiol. Dis. 1997. Vol. 4. P. 58-67.

Wilquet V., De Strooper B. Amyloid-beta precursor protein processing in neurodegeneration // Curr. Opin. Neurobiol. 2004. Vol. 14. P. 582-588.

Wilson D.M., Binder L.I. Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease // Am. J. Pathol. 1997. Vol. 150. P. 2181-2195.

Wimo A., Jonsson L., Winblad B. An estimate of the worldwide prevalence and direct costs of dementia in 2003 // Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 2006. Vol. 21. P. 175-181.

Yanagisawa K., Ihara Y., Miyatake T. Secretory pathway of beta/A4 amyloid protein precursor in familial Alzheimer's disease with Val717 to Ile mutation // Neurosci. Lett. 1992. Vol. 144. P. 43-45.

Zitvogel L., Kepp O., Kroemer G. Decoding cell death signals in inflammation and immunity // Cell. 2010. Vol. 140. P. 798-804.

Роль предшественника амилоидного пептида и его метаболитов в патогенезе болезни Альцгеймера

Н.Н. Наливаева, И.А. Журавин, Э.Дж. Тернер

Содержание

1. Введение
2. Харктеристика амилоидного пептида
   2.1. Свойства и функции белка предшественника амилоидного пептида (APP)
   2.2. Протеолитический процессинг предшественника амилоидного пептида
   2.3. Свойства амилоидного пептида
   2.4. Выведение Аβ из организма и мозга
   2.5. Амилоид-деградирующие ферменты
   2.6. Динамичность уровня содержания Аβ
3. Факторы, влияющие на метаболизм Аβ
4. Регуляция свойств амилоид-деградирующих ферментов
5. Заключение

1. Введение

В связи с увеличением средней продолжительности жизни старческая деменция, в частности, обусловленная развитем болезни Альцгеймера (БА), приобретает все более широкий характер и становится одной из главных причин тяжелой степени инвалидности людей пожилого возраста. В связи с этим в развитых странах исследования патогенеза БА являются одним из приоритетных направлений фундаментальных наук и медицины. Однако, несмотря на интенсивные исследования молекулярных основ патогенеза БА и существенный прогресс в понимании механизмов развития данного заболевания, все еще нет адекватных методов его профилактики и лечения. Это обусловлено тем, что сформулированная более 20 лет назад гипотеза амилоидного каскада (Hardy, Higgins, 1992; Hardy, Selkoe, 2002), которая связывает патогенез БА с уровнем накопления в ткани мозга агрегатов

Сокращения: АКФ, ACE – ангиотензин-конвертирующий фермент; АХЭ – ацетилхолинэстераза; БА – болезнь Альцгеймера; ИДФ – инсулин-деградирующий фермент; ММП – матричные металлопротеиназы; НЕП – неприлизин; НФК – нейрофибриллярный клубок; РАС – ренин-ангиотензиновая система; TTP, TTR – транстиретин; AAV – адено-ассоциированный вектор; ApoE – аполипопротеин; AP-A – аминопептидаза А; APP – белок предшественник амилоидного пептида; Аβ – β-амилоидный пептид; α7nAChR – α7 никотиновые ацетилхолиновые рецепторы; ECE – эндотелин-конвертирующий фермент; FPR2 – формилпептидный рецептор 2 типа; GCP II – глутамат-карбоксипептидаза II; GLP – глюкагонподобный пептид; HDAC – гистонедеацетилаза; HNE – гидроксиноненал; KPI – ингибитор сериновых протеаз типа Кунитца; LTP – долгосрочное потенциирование; MBP – основной белок миелина; miR – микро-РНК; NAAG – N-ацетил-аспартил-глутамат; NCT – никастрин; PAI – ингибитор активатора плазминогена; PS – пресенилины; ROS – активные формы кислорода; siRNAs – небольшие интерферирирующие молекулы РНК; SPP – протеаза сигнальных пептидов; tPA – тканеспецифический активатор плазминогена; uPA – активатор плазминогена урокиназного типа; U1 snRNP – короткие ядерные рибонуклеобелки.

β-амилоидного пептида (Аβ), базируется, в основном, на изучении семейных форм БА, вызванных мутациями определенных генов, хотя в основном они представлены редкими моногенетическими формами, поражающими отдельные семьи в различных районах мира (Brouwers et al., 2008). Для этих заболеваний характерными являются мутации генов белка предшественника амилоидного пептида (APP) или пресенилинов PSN1 и PSN2 (рис. 1). В то же время, БА имеет сложную этиологию, зависящую как от генетических, так и от разнообразных внешних факторов, и у пожилых людей чаще всего наблюдается спорадическая форма БА, не связанная с мутациями данных генов, но, тем не менее, обусловленная изменениями метаболизма амилоидного пептида под действием разных факторов. К их числу относятся гипоксия и ишемия мозга, окислительный стресс, травмы и воспалительные процессы в ткани мозга, снижающие его способность избавляться от токсических молекул по периваскулярному пути (Arbel-Ornath et al., 2013), а также экспрессия аллелей ряда генов, предрасполагающих к развитию БА (в частности, аполипопротеина *APOE*) (см. рис. 1). Как было показано рядом авторов АроЕ связывается с Ab и входит в состав как сенильных бляшек, так и нейрофибриллярных клубков и его экспрессия повышена при БА (Namba et al., 1991). Дальнейшие исследования подтвердили, что у носителей одной из трех аллелей *APOE*, а именно *APOE* ε4, существенно увеличен риск развития БА. Так, у гетерозиготных пациентов он возрастает в 3 раза, а у гомозиготных – в 15 раз. Напротив, наличие аллели *APOE* ε2 имеет защитный характер (Corder et al., 1994).

Исследования последних лет с использованием полногеномного поиска ассоциаций (Genome-Wide Association Study – GWAS), который требует выборок в сотни или тысячи индивидов и обязательной репликации ассоциаций на других попу-

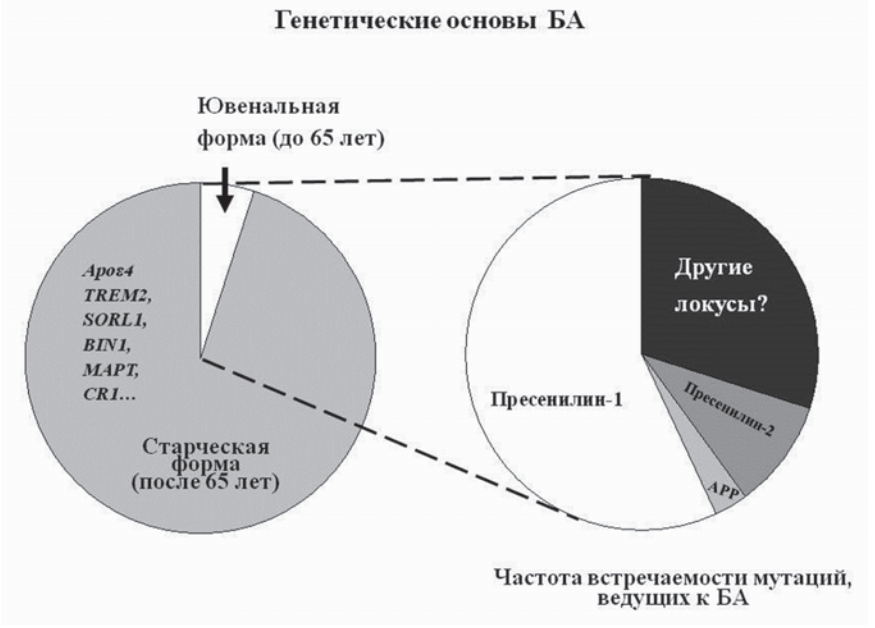


Рис. 1. Частота встречаемости разных форм болезни Альцгеймера и связанных с ними мутаций определенных генов

ляциях, свидетельствуют о возможном вкладе большого числа генов в патогенез старческой формы БА, увеличивая предрасположенность к развитию этого заболевания. К ним помимо *APOE* относятся гены *CLU, PICALM, CR1, BIN1, ABCA7, MS4A6A, CD33, EPHA1, SORL1* и многие другие (Shi et al., 2012; Miyashita et al., 2013). Все перечисленные выше факторы и мутации, способствующие накоплению в ткани мозга токсических форм амилоидного пептида, приводят к гибели нервных клеток и нарушению когнитивных функций. С другой стороны, исследование когорты пожилых людей в Исландии с отсутствием признаков деменции выявило наличие мутации в гене APP (A673T), препятствующей развитию когнитивного дефицита и БА (Jonsson et al., 2012). Это открывает новое перспективное направление в исследовании эндогенных защитных механизмов, которые могут способствовать увеличению продолжительности активной деятельности мозга.

Амилоидный пептид (Aβ), представляющий собой полипептид с молекулярным весом около 4 кДа и состоящий из 36–43 аминокислотных остатков, образуется из молекулы белка предшественника амилоидного пептида, βAPP (β-Amyloid Precursor Protein), или просто APP, в результате протеолиза под действием специфических протеиназ, а именно β- и γ-секретаз. β-секретаза принадлежит к классу аспартамовых протеаз (для обзора см. Kandalepas, Vassar, 2012), в то время как γ-секретаза предаставляет собой сложный многокомпонентный комплекс, в состав которого входят белки пресенилины PS1 и PS2, никастрин, APH1 и PEN2 (De Strooper, 2003; Jurisch-Yaksi et al., 2013). Aβ обладает высоковыраженными фибрилогенными свойствами, и его олигомеры являются токсичными для нервных клеток, вызывая дегенерацию и гибель нейронов (Hardy, Selkoe, 2002; Zhao et al., 2012). Другим характерным морфологическим признаком БА является нарушение цитоскелета нервных клеток и накопление в них нейрофибриллярных клубков (НФК), состоящих в основном из нерастворимых филаментов гиперфосфорилированного белка тау (Avila et al., 2004, Medeiros et al., 2011). В нормальных физиологических условиях тау-протеин регулирует формирование и поддерживает структурную стабильность микротрубочек. В ходе развития БА наблюдается абнормальное гиперфосфорилирование тау, ведущее к дестабилизации и разрушению микротрубочек с последующим высвобождением тау-белка и его агрегации в спиралевидные филаменты (Alonso et al., 2001). Несмотря на то что тау в основном локализуется в аксонах нервных клеток, его недавнее обнаружение в дендритных шипиках указывает на важную роль этого белка в процессах нейрональной пластичности, которая необходима для формирования памяти и реализации когнитивных функций (Gu, Zheng, 2009). Накопление НФК при отсутствии Aβ-патологии наблюдается при ряде других нейродегенеративных заболеваний, а частности, при фронтотемпоральной деменции, которая является второй наиболее часто встречающейся формой когнитивных растройств в возрасте до 65 лет (Cairns et al., 2007). Как и в случае БА, развитие редких семейных форм этого заболевания обусловлено мутациями гена *MAPT*, кодирующего тау-белок (Ballatore et al., 2007). При БА уровень накопления НФК коррелирует со степенью развития заболевания и когнитивным дефицитом, вызванным нарушением синаптической передачи и гибелью нейронов, в основном в коре и гиппокампе мозга (Ittner, Götz, 2011). Хотя есть данные, сви-

детельствующие, что в ходе нейродегенеративного процесса сначала образуются амилоидные фибриллы, которые нарушают функции нервных клеток, а затем в них происходит формирование нейрофибриллярных клубков (Lewis et al., 2001), в настоящее время все еще нет ясной концепции того, как эти два белка взаимодействуют на молекулярном уровне, приводя к патологии. Несмотря на то что при БА, в основном, имеет масто нарушение холинергической синаптической передачи (Cummings, Back, 1998), данные литературы свидетельствуют о том, что данная патология также сопровождается снижением содержания серотонина, норэпинефрина и других моноаминов (Palmer, DeKosky, 1993; Liu et al., 2008).

До недавнего времени считалось, что накопление амилоидных фибрилл с последующим формированием склеротических бляшек в ткани мозга является необратимым процессом, однако сейчас уже не вызывает сомнений тот факт, что амилоидный пептид выводится из ткани мозга как по периваскулярным путям (Weller et al., 2002), так и подвергается протеолитическому расщеплению под действием широкого спектра ферментов (Nalivaeva et al., 2008, 2012a). В связи с этим исследование механизмов освобождения мозга от избытка Ab сейчас считается одним из наиболее перспективных направлений для создания терапевтических средств, направленных на предотвращение и лечение БА (Selkoe, 2012). Согласно современным представлениям, метаболизм APP и Aβ является динамическим процессом, зависящим как от разнообразных внутренних факторов (генетических, клеточных, васкулярных), так и факторов окружающей среды (гипоксия, стресс, диета). Перечисленные факторы могут влиять как на формирование и накопление амилоидного пептида, так и на его деградацию и выведение из мозга. Поскольку частота проявлений БА в пожилом возрасте существенно повышается в связи с нарушением снабжения мозга кислородом при ишемии и инсультах, большое значение приобретают исследования роли гипоксии и ишемии мозга в процессах образования Aβ, а также в экспрессии как амилоид-образующих, так и амилоид-деградирующих ферментов (Дубровская и др., 2009; Журавин и др., 2007, 2011; Fisk et al., 2007; Nalivaeva et al., 2008; Rybnikova et al., 2012).

Несмотря на всестороннее изучение процессов формировании токсичного амилоидного пептида, все еще нет ясного представления о биологической значимости его белка-предшественника – APP, хотя накопленные к нстоящему времени данные позволяют считать, что продукты его расщепления играют важную роль в нормальном функционировании нервной ткани (для обзора см. Octave et al., 2013; Nalivaeva, Turner, 2013). Так, например, Aβ в низких физиологических концентрациях является классическим нейропептидом и выполняет ряд важных функций (Pearson, Peers, 2006), растворимые формы APP (sAPPα и sAPPβ) являются нейропротекторными (Chasseigneaux, Allinquant, 2012), а образующийся под действием γ-секретазы С-концевой фрагмент APP (AICD) является транскрипционным фактором, регулирующим экспрессию ряда нейрональных генов, в том числе амилоид-деградирующей нейропептидазы неприлизин (НЕП) (Belyaev et al., 2009; Beckett et al., 2012; Pardossi-Piquard, Checler, 2012). Дефицит активности НЕП и ряда других амилоид-деградирующих ферментов, способных расщеплять Aβ и препятствовать накоплению его токсических форм, вносит существенный вклад в развитие спорадической

формы БА (Nalivaeva et al., 2012c; Pluta et al., 2013; Stargardt et al., 2013). Исследование механизмов регуляции НЕП при участии AICD показало, что этот процесс носит специфический для нервных клеток характер и зависит от уровня экспрессии нейрональной изоформы APP (APP_{695}) (Belyaev et al., 2010). В ходе активации экспрессии гена НЕП уровень связывания AICD с его промотором повышается и одновременно происходит снижение связывания с ним гистонедеацетилаз (в частности HDAC1). Действие HDAC ингибиторов на клетки с низким уровнем экспрессии НЕП также приводит к увеличению связывания AICD с промотором гена НЕП и повышению его экспрессии. Поскольку уровень экспрессии и активности НЕП существенно снижается с возрастом, а также при гипоксии и ишемии мозга, приводя к развитию когнитивных расстройств и БА (Nalivaeva et al., 2003, 2004; Wang et al., 2010), направленное повышение уровня экспрессии НЕП в ткани мозга имеет большое практическое значение. В связи с этим поиск соединений, способных повышать уровень НЕП и снижать накопление амилоидного пептида, рассматривается как одно из перспективных направлений для создания средств профилактики БА. Развивая эти исследования, нами было показано, что введение животным антиконвульсивного препарата вальпроата натрия, который также является ингибитором гистондеацетилаз, приводит к повышению активности и экспрессии НЕП в коре и гиппокампе мозга и снижению когнитивных нарушений (Журавин и др., 2011; Nalivaeva et al., 2012b). Недавно нами было выявлено, что белок транстиретин (TTP), который способен связывать и выводить Аβ из ткани мозга (Buxbaum et al., 2008), регулируется в нейрональных клетках сходным с НЕП образом, а инкубация клеток нейробластомы с вальпроатом натрия приводит к одновременному повышению уровня экспрессии НЕП и TTP и снижению содержания Аβ (Kerridge et al., submittted). Полученные данные имеют большое практическое значение и позволяют надеяться на создание терапии, направленной на повышение содержания и активности амилоид-выводящих белков, уровень которых снижается при старении и развитии БА.

Как отмечалось на недавних международных совещаниях по патогенезу нейродегенеративных заболеваний и БА, разработка путей повышения способности мозга справляться с изменениями его гомеостаза и накоплением амилоидного пептида за счет активации ферментов его деградации, а также эффективности его удаления из нервной ткани, является на данный момент наиболее приоритетным и перспективным направлением исследований (Holtzman et al., 2012; Sagare et al., 2012). С другой стороны, метаанализ данных литературы (Bertram, Tanzi, 2008), а также развитие современных методов генотипирования и карт однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) увеличивает список генов, повышающих риск развития БА или, напротив, предотвращающих это заболевание (Shi et al., 2012; Jonsson et al., 2012), что позволяет надеяться на создание более эффективных методов ранней диагностики и средств терапии этого заболевания. Накопленный опыт свидетельствует, что за более чем два десятилетия теория амилоидного каскада, лежащая в основе наших представлений о патогенезе БА, все еще не утратила своей значимости и, наоборот, позволяет критически относиться к полученному массиву данных и фокусировать внимание исследователей на ниболее перспективных направлениях исследований (Goate, Hardy, 2012).

2. Харктеристика амилоидного пептида

2.1. Свойства и функции белка предшественника амилоидного пептида (APP)

APP представляет собой конститутивный трансмембранный белок, состоящий из 695–770 аминокислот. Он экспрессируется в различных клетках и тканях животных разного уровня эволюционного развития (Johnstone et al., 1991) и принадлежит к большому эволюционно консервативному семейству белков, которое содержит 16 известных на сегодняшний день ортологов (Coulson et al., 2000; Eggert et al., 2004). В клетках млекопитающих описаны два гомолога APP, так называемые APP-подобные белки APLP1 и APLP2 (Jacobsen, Iverfeldt, 2009). В настоящее время известны три изоформы APP (APP_{770}, APP_{751} и APP_{695}), являющиеся продуктами альтернативного сплайсинга его пре-мРНК и отличающиеся по степени их гликозилирования (рис. 2). APLP1 и APLP2 также подвергаются гликозилированию, но точные сайты этих посттрансляционных модификаций пока не определены (Eggert et al., 2004). Большая часть молекулы APP (N-концевой фрагмент) находится во внеклеточном пространстве или повернута внутрь везикулярных клеточных органелл, в то время как короткий С-концевой фрагмент молекулы находится в цитоплазме клеток. В нейронах присутствует, в основном, более короткая форма APP_{695}, которая лишена на своем внеклеточном участке домена ингибитора сериновых протеаз типа Кунитца (KPI, kunitz ptrotease inhibitor) и OX-2-домена, роль которых до сих пор не

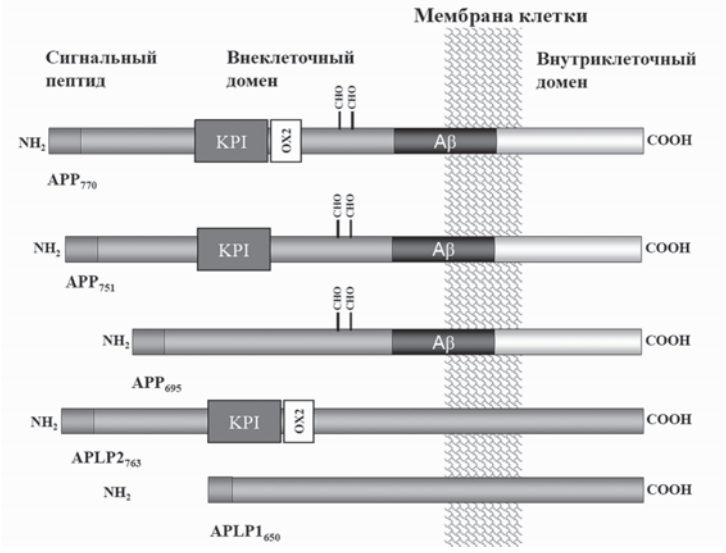


Рис. 2. Схема строения основных изоформ молекулы APP и расположения участков их протеолитического расщепления

Предшественник амилоидного пептида – APP, представлен тремя изоформами, содержащими 695, 751 и 770 аминокислотных остатков и отличающимися наличием KPI и/или OX2 доменов. Два APP-подобных белка, APLP1 и APLP2, содержат 650 и 763 аминокислоты, соответственно, и также различаются наличием KPI и OX2 доменов. CHO – сайты гликозилирования APP

ясна, хотя имеются данные о том, что экспрессия KPI-домена связана с митохондриальной функцией клеток (Chua et al., 2013). В коре мозга человека соотношение различных форм APP составляет APP_{770}:APP_{751}:APP_{695}=1:10:20 (Tanaka et al., 1989). При развитии БА в ткани мозга наблюдается увеличение содержания APP_{770} и APP_{751} и снижение APP_{695} (Moir et al., 1998). Еще одним различием изоформ APP является то, что что только нейрональная изоформа APP_{695} принимает участие в регуляции экспрессии генов в клетках нерйонального происхождения (Belyaev et al., 2010).

Основным отличием APLP1 и APLP2 от APP является то, что фрагменты их молекул, образующиеся в результате протеолитического расщепления, и соответствующие последовательности амилоидного пептида в молекуле APP не образуют амилоидных депозитов. Это объясняется отсутствием в составе этих белков участка (а также соответствующего домена в кодирующих их генах), способствующего формированию амилоидного пептида, характерного для БА (Maloney et al., 2004). В этой же связи интересно отметить, что аминокислотная последовательность APP грызунов (мышей и крыс) на участке, соответствующем Aβ-пептиду, отличается от таковой человека по трем аминокислотам (Arg^5 замещен на Gly, Tyr^{10} на Phe и His^{13} на Arg) (Fraser et al., 1992), что препятствует образованию типичных Aβ-агрегатов в мозге этих животных. Как было показано, наличие гистидина в положении 13 является критическим для способности Aβ связывать ионы цинка, необходимые для агрегации молекул пептида и образования фибрилл (Bush, Tanzi, 2002). Именно эта аминокислота отсутствует в данном положении в молекуле Aβ крыс и мышей.

Согласно имеющимся литературным данным, APP обладает нейротрофическими и нейропротекторными свойствами, модулирует рост нервных окончаний и синаптогенез, участвует в обеспечении возбудимости нервных клеток и синаптической пластичности, а также в процессах обучения и памяти (см. обзоры: Mattson, 1999; Nalivaeva, Turner, 2013). В частности, в процессе развития мозга APP необходим для правильной миграции нейрональных клеток-предшественников в кортикальную пластину (Young-Pearse et al., 2007). В ходе развития мозга разные изоформы APP экспрессируются избирательно (Apelt et al., 1997) под действием многочисленных факторов (Lahiri et al., 1995). APLP белки тоже обладают синаптогенными свойствами (Thinakaran et al., 1995), а также свойствами регуляторов генной активности и пролиферации клеток. APP и APLP2 принимают участие в метаболизме меди (White et al., 1999). В свою очередь, ионы меди модулируют экспрессию гена APP (Bellingham et al., 2004).

Хотя функции APP еще не полностью установлены, известно, что APP взаимодействует со многими белками и эти взаимодействия играют важную роль в нормальном транспорте, процессинге и внутриклеточных сигнальных каскадах (Aydin et al., 2012). Так, по данным конфокальной микроскопии APP, колокализуется с синаптическими белками, например синаптотагмином (Kohli et al., 2012). Повышение содержания APP в ткани мозга в ходе активного синаптогенеза также свидетельствет о его важной роли в формировании нейрональных связей. Недавно было показано, что APP необходим для поддержания кальциевого гомеостаза и клеточных осцилляций, которые лежат в основе синаптической передачи (Octave

et al., 2013). Растворимая форма APP, высвобождаемая под действием α-секретазы (sAPPα), также регулирует уровень плотности дендриных шипиков и тем самым принимает участие в процессах обучения и памяти (Jung, Herms, 2012; Tyan et al., 2012). Более того, APP и APLP2 играют важную роль в пространственном обучении и долгосрочном потенциировании (LTP) (Weyer et al., 2012).

Несмотря на то что APP и его аналоги выполняют столь важные функции в жизнедеятельности клеток и организма, трансгенные мыши, лишенные гена APP, являются весьма жизнеспособными и фертильными, хотя и обладают меньшим весом, чем мыши дикого типа, и у них наблюдается локомоторный дефицит. В мозге этих трансгенных мышей к 2 неделям жизни имеет место значительный глиозис, что свидетельствует о нарушении нейрональных функций, вызванных отсутствием в клетках молекул APP (Zheng et al., 1995). Трансгенные мыши, лишенные гена APP, а также гена APLP1 или APLP2, тоже являются жизнеспособными, и только тройная мутация APLP1(-/-)/APP(-/-)/APLP2(+/-) приводит к постнатальной гибели животных (Heber et al., 2000).

Данные по клонированию и изучению структуры APP позволяют предположить, что он обладает многими характеристиками, свойственными мембраносвязанным рецепторным молекулам. В частности, работы по реконституции APP_{695} и тримерных G-белков свидетельствуют, что APP может функционировать как рецептор, сопряженный с G-белками (Okamoto et al., 1995). Тем не менее, до сих пор не ясно, что является и существуют ли эндогенные лиганды к рецептору, представленному молекулами APP, хотя совсем недавно было показано, что представитель одного из классов молекул клеточной адгезии, а именно TAG-1, является реальным кандидатом на роль лиганда APP (Ma et al., 2008).

Поскольку регуляция экспрессии гена APP находится под контролем многих факторов, в частности фактора роста TGF-β, цитокина IL-1 и транскирипционного фактора Sp1 (Ge, Lahiri, 2002; Citron et al., 2008), это рассматривается как один из возможных путей направленного контроля экспрессии APP с целью снижения образования токсичного Aβ. Однако, принимая во внимание участие APP в синаптогенезе и функционировании нервной системы, данный подход к лечению БА мы представляем неперспективным, поскольку снижение экспрессии APP и родственных ему APPL1/2 может повлечь нежелательные побочные эффекты.

Недавно было показано, что микро-РНК (miR), представляющие собой короткие некодирующие РНК, взаимодействующие с молекулами РНК-мишеней и ингибирующими их трансляцию или транспорт, также принимают участие в регуляции экспрессии гена APP и играют важную роль в развитии нейродегенерации (Salta, De Strooper, 2012). В частности, miR-101 и miR-153 снижают экспрессию APP в культуре нейрональных клеток человека, предполагая их возможное участие в патогенезе БА (Long, Lahiri, 2011; Long et al., 2012). Поскольку микро-РНК играют важную роль в эпигенетической регуляции экспрессии генов, весьма вероятно, что их нормальное функционирование изменяется в ходе патогенеза БА. Данные последних лет свидетельствуют, что существует довольно много форм микро-РНК, которые нарушены при данной патологии и их дальнейшее исследование может иметь большое теоретическое и практическое значение (Van den Hove et al., 2013).

2.2. Протеолитический процессинг предшественника амилоидного пептида

Уровень содержания APP в клетках и тканях регулируется при помощи его направленного протеолиза под действием специфических ферментов, расщепляющих этот трансмембранный белок с образованием ряда растворимых биологически активных продуктов. В настоящее время выделяют три основные сайта расщепления APP под действием различных ферментов или белковых комплексов, называемых собирательно α-, β- и γ-секретазами. Они способны расщеплять APP с образованием фрагментов разной длины, обладающих определенными функциональными свойствами (рис. 3). В результате действия α- или β-секретаз образуются крупные растворимые белки sAPPα и sAPPβ, играющие важную роль в процессах пролиферации нервных клеток и развитии нервной ткани (Caille et al., 2004; Turner et al., 2007; Chasseigneaux, Allinquant, 2012), и мембраносвязанные фрагменты C83 и C99. В результате действия γ-секретазы на C99 образуется Aβ и короткий цитоплазматический фрагмент AICD, играющий важную регуляторную роль (Müller et al., 2008; Beckett et al., 2012), а при действии на C83 – короткий пептид p3 с неизвестными функциями и AICD, который быстро подвергается протеолитическому расщеплению (Beckett et al, 2012; Venugopal et al., 2007). Таким образом, катаболизм APP может осуществляться как по амилоидогенному пути в результате действия β- и

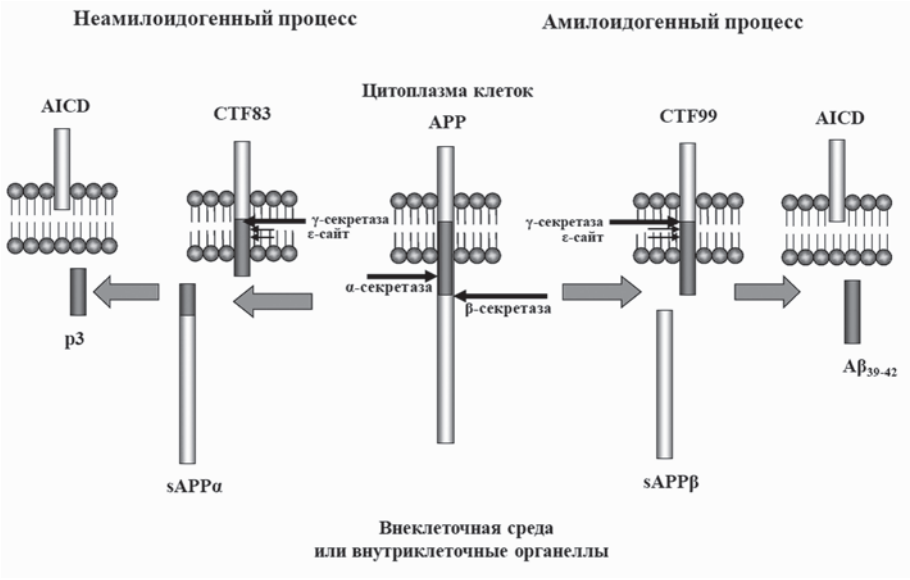


Рис. 3. Амилоидогенный и неамилоидогенный пути расщепления APP

При неамилоидогенном расщеплении, по которому метаболизирует 95% APP, молекула этого белка подвергается действию α-секретазы с образованием растворимого sAPPα и мембраносвязанного C-концевого фрагмента C83, из которого под действием γ-секретазы образуется AICD и короткий нетоксичный пептид p3. При амилоидогенном пути APP сначала расщепляется β-секретазой с образованием растворимого sAPPβ и мембраносвязанного C-концевого фрагмента C99, из которого в результате действия γ-секретазы образуется Aβ и транскрипционно активный AICD

γ-секретаз с образованием Аβ, так и по неамилоидогенному пути, в котором принимает участие α-секретаза (Hooper, Turner, 2002). Этот фермент расщепляет APP внутри последовательности Аβ между лизином и лейцином в положении 16 и 17, соответственно, тем самым предотвращая образование Аβ пептида. Исходя их этого, регуляция (повышение) активности α-секретазы является одним из возможных подходов для профилактики БА (Lichtenthaler, Haass, 2004; Fahrenholz, 2007). Помимо α-, β- и γ-участков расщепления APP выделяют также сайты, обозначаемые как ε- и δ. В то время как ε-участок находится в непосредственной близости от места действия γ-секретазы, приводя к образованию APPε, который является субстратом основных секретаз (Lefranc-Jullien et al., 2006), δ-сайт локализован в районе действия β-секретазы (12 аминокислотных остатков от N-конца Аβ) и также приводит к образованию пептида, склонного к аггрегации (Eggert et al., 2004). Однако до настоящего времени расщепление APP по этому пути было обнаружено только в гиппокампальных нейронах (Simons et al., 1996) и не подтверждено другими исследователями. С другой стороны, δ-сайт расположен совсем рядом с недавно обнаруженным участком действия β-секретазы-1 (BACE1), которая расщепляет APP возле Glu11 (относительно N-конца на участке Аβ) и продукт расщепления образующегося при этом С-концевого фрагмента APP (APP89) является субстратом γ-секретазы, высвобождающей неамилоидогенный укороченный Аβ-пептид (Deng et al., 2013).

В настоящее время известно несколько белков, которым приписывают α-секретазную активность. В основном это цинк-зависимые металлопротеиназы, или адамализины, принадлежащие к семейству ADAM (a disentegrin and metalloprotease), в частности ADAM10 и ADAM17 (Hooper, Turner, 2002; Deuss et al., 2008, Vincent, Checler, 2012). ADAM17 также известен как TACE (TNFa-конвертирующий фермент), принимающий участие в секреции фактора некроза опухолей (Allinson et al., 2004). ADAM9, или MDC9, также обладает α-секретазной активностью (Koike et al., 1999). Конститутивный процесс секреции растворимого APP (sAPPa) под действием α-секретазы (см. рис. 3) происходит на поверхности клеток (Parvathy et al., 1999) и по этому пути происходит расщепление до 90% всего клеточного APP. В то же время, регулируемая различными факторами, например, холинергическими агонистами мускарином и карбахолом (Canet-Aviles et al., 2002) или форболовыми эфирами (Zhu et al., 2001) активность α-секретазы локализуется, в основном, в аппарате Гольджи. Активность α-секретазы ингибируется пептид-гидроксаматами, в частности батимастатом (Parvathy et al., 1999). При умеренной оверэкспрессии белка ADAM10 в нейрональных клетках образование Аβ снижается и формирования сенильных бляшек не наблюдается. Напротив, экспрессия мутантных молекул ADAM10, не способных к протеолизу APP, приводит к увеличению числа амилоидных бляшек в мозге трансгенных мышей, экспрессирующих мутантный человеческий APP (Postina et al., 2004). Трансгенные животные, лишенные гена ADAM10 или ADAM17, являются нежизнеспособными, свидетельствуя о важной роли α-секретазы в жизнедеятельности организма (Sahin et al., 2004).

Образуемый в результате действия α-секретазы внеклеточный фрагмент sAPPa обладает не только нейропротекторными свойствами, но также свойствами эпидермального фактора роста (Wehner et al., 2004), а также способствует обучению

и памяти (Turner et al., 2007; Chasseigneaux, Allinquant, 2012). Образование sAPPα посредством активации α-секретазы находится под контролем рецепторов, сопряженных с G-белками (Racchi, Govoni, 2003), а также таких факторов, как Epac, регулирующий цАМФ-зависимый обмен гуаниновых нуклеотидов, и ГТФ-аза Rac (Robert et al., 2005). Важную роль в регуляции активности α-секретазы также играют ионы железа (Bodovitz et al., 1995).

Еще один продукт, образующийся при неамилоидогенном расщепления APP α-секретазой, представляет собой С-концевой фрагмент молекулы APP (C83), состоящий из 83 аминокислотных остатков и являющийся субстратом γ-секретазы (см. рис. 3). При его расщеплении образуется внутриклеточный С-концевой фрагмент APP (AICD) и короткий пептид массой около 3 кДа (p3). Свойства p3 пептидов, состоящих из аминокислотных остатков 17–40 или 17–42 последовательности Aβ, пока не известны. Согласно имеющимся данным, AICD, образующийся по α-секретазному пути, быстро подвергается протеолитическому расщеплению и не вносит существенный вклад в регуляцию генов (для обзора см. Beckett et al., 2012). В целом, эта часть процесса протеолиза APP, запускаемого α-секретазой, считается неамилоидогенной и не играющей существенной роли в патологии БА (Kimberly et al., 2000).

Образование Aβ требует участия двух ферментов, именуемых β- и γ-секретазами (для обзора см. Mattson, 2004). В ходе многолетних исследований было показано, что фермент, обладающий β-секретазной активностью, является новым представителем семейства трансмембранных аспартатных протеаз. Этот фермент, получивший название β-site APP-cleaving enzyme, или BACE1 (другие названия Asp2 и мемапсин), инициирует образование Aβ (Vassar, 2004). В литературе описан еще один фермент, гомологичный BACE1 и получивший название BACE2. Этот фермент также обладает β-секретазной активностью по отношению к APP (Bennett et al., 2000).

BACE1 является трансмембранным белком, состоящим из 501 аминокислотного остатка. Активная форма этого фермента, подобно другим аспартатным протеазам, таким как пепсин и катепсин Д, образуется путем отщепления 23 аминокислотных остатков от неактивной молекулы белка-предшественника. Однако BACE1 отличается от указанных протеаз по вторичной структуре (Hong et al., 2000). В литературе описано несколько вариантов посттрансляционных модификаций этого фермента, которые вносят разный вклад в патогенез БА (для обзора см. Holsinger et al., 2013). BACE1 расщепляет APP между метионином и аспартатом в положении 671 и 672, соответственно, в молекуле APP, состоящей из 770 аминокислот (Haass et al., 1992). BACE2 также способен расщеплять APP на этом участке, а также ближе к С-концевому участку молекулы – в районе тирозина-10 и глутамата-11 внутри последовательности Aβ, что ведет к образованию более короткого варианта Aβ (Farzan et al., 2000). Как было показано совсем недавно, BACE1 также расщепляет APP на этом участке и, по мнению авторов, в нормально функционирующем мозге этот процесс преобладает. Однако наличие мутаций в молекуле APP или другие патологические воздействия приводят к предпочтительному расщеплению APP с образованием токсичного Aβ (Deng et al., 2013). Как было показано в наших исследованиях, нейрональная изоформа APP_{695} расщепляется преимущественно по β-секретазному пути с образованием Aβ и транскрипционно активного AICD (Belyaev et al., 2010).

С терапевтической точки зрения, BACE1 представляет собой довольно перспективный фермент, поскольку мыши, лишенные гена этого белка, не образуют Аβ и являются жизнеспособными (Luo et al., 2001). В связи с этим было предложено несколько подходов для создания эффективных ингибиторов β-секретазной активности у человека в основном с использованием пептидомиметиков, являющихся не превращаемыми аналогами субстратов BACE. Другой подход предусматривает создание молекул, распознающих BACE1 мРНК и снижающих его экспрессию. Последние включают в себя антисмысловые олигонуклеотиды, каталитические нуклеиновые кислоты – рибозимы и дезоксирибозимы, а также небольшие интерферирирующие молекулы РНК (siRNAs) (Nawrot, 2004). Тем не менее, недавно были обнаружены новые эндогенные субстраты BACE1, что заставляет относиться к созданию ингибиторов этого фермента с определенной осторожностью. В частности, было показано, что BACE1 играет важную роль в функционироавнии сетчатки и подавление ее активности приводит к ретинопатии (Cai et al., 2012).

Весьма неожиданным, но с биохимической точки зрения предсказуемым, было обнаружение того, что активность β-секретазы регулируется конститутивными клеточными белками прионами PrP^{C}, модифицированные формы которых (PrP^{Sc}) являются патогенным фактором развития болезней Крейцфельда-Якоба и коровьего бешенства (Parkin et al., 2007). Это указывает на наличие связи между метаболизмом Аβ и PrP^{C}. В нормальном мозге последние регулируют активность β-секретазы, препятствуя накоплению Аβ. Нарушение синтеза PrP^{C} или его конформации в случае болезней Крейцфельда-Якоба или коровьего бешенства ведет к накоплению амилоидного пептида, что также является характерным признаком данных заболеваний (Hooper, Turner, 2008). С другой стороны, мутации APP, приводящие к развитию ювенильной формы БА, также нарушают процесс регуляции BACE1 при участии PrP^{C}, что приводит к усугублению патологии (Griffiths et al., 2011).

Как уже упоминалось выше, вторым ферментом, принимающим участие в образовании Аβ, является γ-секретаза, представляющая собой сложный комплекс из нескольких белковых молекул. До сих пор нет окончательного мнения относительно состава и строения γ-секретазы, однако общепринято, что это многокомпонентный комплекс, состоящий из белков пресенилинов 1 и 2 (PS1 и PS2), никастрина (NCT) и белков Aph-1 и Pen-2 (Shirotani et al., 2004; для обзора см. Wolfe, 2012). Помимо протеолитического расщепления С-концевого фрагмента APP γ-секретазный комплекс принимает участие в недавно открытом, но еще мало понятном пути регулируемого трансмембранного протеолиза (protein RIPing) (Heldin, Ericsson, 2001). Компонент γ-секретазы PS1 также принимает участие в протеолитическом расщеплении сигнальных молекул Notch, играющих важную роль в развитии ЦНС (для обзора см. Lathia et al., 2008).

Белки пресенилины были открыты в ходе скрининга генетических мутаций, ведущих к формированию ювенальной формы БА (Sherrington et al., 1995; Rogaev et al., 1995). Пресенилины вместе с протеазами сигнальных пептидов (SPP) представляют собой новый класс протеаз, являющихся интегральными мембранными белками, в основе деятельности которых лежат каталитические свойства классических аспартатных протеиназ, таких как пепсин, ренин и катепсин Д. Характер-

ной чертой пресенилинов и протеаз сигнальных пептидов является их способность расщеплять полипептидные субстраты внутри трансмембранного домена. Это требует присутствия в каталитическом участке молекул этих ферментов двух соседствующих остатков аспартата и консервативного Про-Ала-Лей мотива в С-концевой части их молекул. Именно пресенилины, как было подтверждено рядом авторов, являются каталитическими субъединицами мультипротеинового комплекса, который проявляет γ-секретазную активность (De Strooper, 2003). Клеточные и молекулярно-биологические исследования показали, что пресенилины и их гомологи имеют 9 трансмембранных доменов, а недавно полученная кристаллическая структура этого белка представляет платформу для выяснения субстратной специфичности этих ферментов и создания их ингибиторов (Wolfe, 2013).

В физиологических условиях APP может расщепляться не только внутри его трансмембранного домена, но также на цитоплазматическом участке, близком к плазматической мембране, с образованием С-концевого фрагмента С50 и более длинного фрагмента APPε, который, в свою очередь, является субстратом α- и β-секретаз, а также γ-секретазы (Lefranc-Jullien et al., 2006). Как было показано, расщепление APP на γ- и ε-участках представляет собой два независимых процесса, которые регулируются разными механизмами. При БА имеет место достоверное снижение ε-секретазной активности (Kametani, 2008).

В результате действия γ-секретазы на С99 фрагмент APP образуется набор Aβ пептидов, содержащих 40, 42 или 43 аминокислотных остатка, что предполагает тем самым существование нескольких сайтов расщепления. Тем не менее, $Aβ_{40}$ образуется в наибольшей концентрации, в то время как $Aβ_{42}$ является более токсичным, менее растворимым и с большей готовностью образует конгломераты (El-Agnaf et al., 2000). Исследования мембранной топологии убедительно показали, что мутации APP в районе трансмембранного домена драматически изменяют соотношение $Aβ_{40}/Aβ_{42}$ в сторону образования высоких концентраций более токсичной формы $Aβ_{42}$ (Lichtenthaler et al., 1999). Механизм, в результате которого мутации в молекуле APP и пресенилинов ведут к гиперпродукции более длинных изоформ Aβ, пока еще не известен, но в данном направлении ведутся довольно многочисленные исследования (Van Dijk et al., 2004).

Недано было показано, что активность γ-секретазы находится под контролем β-аррестина 2, принадлежащего к классу соединений, контролирующих многочисленные функции рецепторов, связанных с G-белками. Так, при развитии БА аррестин 2 непосредственно связывается с Aph-1, приводя к предпочтительному распределению γ-секретазного комплекса в липидные домены клеточных мембран, обогащенные сфинголипидами и холестерином, где происходит амилоидогенное расщепление APP и образование Aβ. Это ведет к повышению концентрации последнего и усугублению патологии (Thathiah et al., 2013).

Несмотря на то что создание ингибиторов γ-секретазного комплекса для предотвращения формирования Aβ и развития БА является весьма привлекательным теоретическим подходом, он имеет определенные ограничения, поскольку мыши, лишенные обеих аллелей гена PS-1, погибают, демонстрируя существенную патологию развития (Shen et al., 1997). Более того, ингибиторы γ-секретаз также приводят

к патологии развития вследствие нарушения сигнальных процессов, осуществляемых посредством рецепторов Notch (Kopan, Ilagan, 2009). Это диктует необходимость направленного поиска способов ограничения протеолиза APP при участии γ-секретазы, которые бы не затрагивали процессинг Notch рецепторов (Wolfe, 2012).

В апоптотических клетках и в мозге больных деменцией альцгеймеровского типа APP помимо секретаз может также подвергаться альтернативному протеолизу под действием каспазы-3 и каспазы-8 (Gunyuzlu et al., 2000). Расщепление под действием каспаз происходит внутри цитоплазматического домена молекулы APP в районе аспартата 664 (в молекуле APP, состоящей из 695 аминокислотных остатков). Продукты протеолиза APP каспазами являются очень токсичными. В нормально функционирующих клетках есть механизм защиты APP от действия каспаз посредством фосфорилирования остатка аминокислоты треонина в положении 668 молекулы APP. Изменение характера фосфорилирования APP и повышение его чувствительности к каспазам рассматривается как один из факторов патогенеза БА (Taru et el., 2004). При определенных условиях каспазы также расшепляют цитоплазматический фрагмент APP (AICD), который принимает участие в регуляции экспрессии ряда генов, о чем более подробно будет изложено в последующих разделах данной главы.

Протеолитический процессинг APP, как было показано в многочисленных исследованиях, происходит в так называемых липидных рафтах, которые представляют собой специализированные домены клеточных мембран, обогащенные холестерином и ганглиозидами, в частности GM1 (для обзора см. Hicks et al., 2012). Эти домены играют важную роль в функционировании клеток, обеспечивая такие функции, как связывание лигандов (включая вирусы и олигомеры Aβ) и передача сигналов, развитие аксонов и поддержание целостности синаптических окончаний. Именно на этих участках происходит взаимодействие APP и BACE1 и инициируется процесс образования Aβ. Нарушение целостности этих мембранных структур приводит к клеточной гибели и нейродегенерации. В связи с этим модификации липидного состава нервной ткани являются одними из важных факторов, влияющими на амилоидный метаболизм и развитие БА (Walter, van Echten-Deckert, 2013).

Помимо процессов расщепления APP, которые вносят свой вклад в патогенез БА, существенную роль в определении амилоидного метаболизма также играют процессы транскрипции и трансляции гена APP, которые приводят к формированию его изоформ, а также генов его основных секретаз. В недавних исследованиях было показано наличие корреляции между уровнем накопления в нерастворимых белковых комплексах, характерных для БА и других нейродегенеративных заболеваний, коротких ядерных рибонуклеобелков (U1 snRNP), принимающих участие в сплайсинге молекул мРНК, и уровнем развития когнитивного дефицита на стадии MCI и БА. Авторы высказывают прпредположение, что дефицит активности этих U1 snRNP комплексов приводит к нарушению нормального сплайсинга мРНК и накоплению неспецифических для нервных клеток изоформ белков, в частности APP и BACE1 (Bai et al., 2013). С другой стороны, становится все более очевидным, что короткие некодириующие микро-РНК (miR) также обеспечивают контроль за синтезом APP и других белков, вовлеченных в патогеенез БА, и эти процессы могут

быть нарушены или изменены при патогенезе БА (Lau et al., 2013). Так, в частности, была показана роль miR-29a/b в синтезе BACE1 и расщеплении APP (Hérbert et al., 2008). В целом, молекулы miR в настоящее время рассматриваются как возможные маркеры БА (Kiko et al., 2014).

2.3. Свойства амилоидного пептида

В результате протеолитического расщепления APP образуется несколько молекулярных вариантов Aβ, включающих от 39 до 43 аминокислотных остатков. В ткани мозга и спинномозговой жидкости в основном присутствует $Aβ_{40}$, который составляет у здоровых людей 90% от общего содержания этого пептида. Однако в мозге пациентов с БА основной формой амилоидного пептида является $Aβ_{42}$ (Gregory, Halliday, 2005), что может свидетельствовать как о преимущественном катаболизме $Aβ_{40}$, так и увеличенной продукции и накоплении более токсичного $Aβ_{42}$ при развитии заболевания. Помимо $Aβ_{40}$ и $Aβ_{42}$ в ткани мозга и в составе амилоидных склеротических бляшек обнаруживаются также укороченные с обеих сторон варианты Aβ (Mori et al., 1992). Повышенному образованию $Aβ_{42}$ способствует не только наличие мутаций гена *APP*, но также и генов пресенилина *PS1* и *PS2* (Borchelt et al., 1996; Kowalska, 2003; Okochi et al., 2013). Наличие таких мутаций у людей приводит к развитию ранних, генетически обусловленных «фамильных» форм БА. С использованием трансгенных животных и клинического материала было показано, что на самых первых этапах развития АД патологии в ткани мозга сначала образуется еще более токсичный $Aβ_{43}$ и его накопление предшествует накоплению $Aβ_{42}$ и $Aβ_{40}$, которые образуются из $Aβ_{43}$ при действии карбоксипептидаз, в частности ангиотензин-конвертирующих ферментов ACE2 и ACE (Zou et al., 2013).

Как было показано в многочисленных исследованиях, накопление Aβ в ткани мозга индуцирует гибель нейронов (для обзора см. Walsh et al., 2002), причем агрегаты Aβ являются более токсичными для нейронов, чем растворимые пептиды (Haass, Selkoe, 2007). Также было установлено, что присутствие $Aβ_{42}$ является одним из необходимых условий для инициации образования амилоидных агрегатов и фибрилл (McGowan et al., 2005). В очагах накопления амилоидных депозитов и вокруг гибнущих нейронов наблюдается активация микроглии, сопровождающаяся выбросом цитокинов и развитием нейроиммунного ответа (Mrak and Griffin, 2005). При инъекциях Aβ также наблюдается нарушение функций мозга и гибель нейронов (McKee et al., 1998; Степаничев и др., 2002). Накопление Aβ как вне, так и внутри клеток сопровождается активацией каспаз, являющихся эффекторами апоптоза (Hitomi et al., 2004). Как было показано в недавних исследованиях, токсическое действие $Aβ_{42}$ осуществляется через формилпептидные рецепторы 2 типа (FPR2). Это приводит к изменению свойств стволовых клеток, в частности в гиппокампе, и препятствует нейрогенезу, что является одной из причин нарушения памяти и развития деменции при БА (Mu, Gage, 2011). В ходе этого процесса запускаются сигнальные механизмы активации p38 MAPK в ответ на образование и накопление активных форм кислорода (ROS), вызванные $Aβ_{42}$ (He et al., 2013).

Предполагают, что в ходе развития БА основными участками нейродегенеративных изменений являются синапсы. Так, было показано, что добавление Аβ к культивируемым гиппокампальным нейронам увеличивает уровень протеазоактивируемого рецептора PAR4 в синапсах и дендритах, что индуцирует необратимые изменения в митохондриях синаптических окончаний и активирует каспазы (Mattson et al., 2001). Кроме того, в ответ на деполяризацию, параллельно с увеличением продукции Аβ повышается уровень цитоплазматического кальция, что также губительно действует на клетки. При наличии предрасположенности к амилоидогенному протеолизу APP, как, например у PS-1 трансгенных мышей, этот процесс протекает в более выраженной степени (Nizzari et al., 2012).

В исследованиях Д. Селко и коллег было показано, что олигомеры Аβ, извлеченные из мозга людей с БА, способны в значительной степени подавлять долгосрочное потенциирование (LTP), а также снижать плотность дендритных шипиков в гиппокампе грызунов (Shankar et al., 2008). При этом ни мономеры Аβ, ни его конгломераты в составе сенильных бляшек не обладают подобными эффектами. Хотя эти данные свидетельствуют об отсутствии токсичности у самих сенильных бляшек, плотность нервных клеток на их периферии значительно снижена, что, возможно, является результатом действия олигомеров Аβ, высвобождающихся из бляшек при действии различных ферментов. С другой стороны, это также подтверждает гипотезу, что связывание Аβ в нерастворимые комплексы может быть способом защиты мозга от повреждающего действия его растворимых форм.

Несмотря на многочисленные исследования, поддерживающие амилоидную гипотезу патогенеза БА и рассматривающие только нейротоксические свойства Аβ, существуют доказательства того, что Аβ в нормальных физиологических концентрациях является физиологически значимым нейропептидом и играет важную роль в жизнедеятельности нервных клеток и их структурно-функциональной пластичности, обуславливающих обучение и память (Koudinov, Berezov, 2004; Pearson, Peers, 2006). Более того, $Aβ_{40}$ и $Aβ_{42}$ могут повышать экспрессию и активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) через α7 никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (α7nAChR), причем этот эффект не сопровождается их токсическим действием и снимается в присутствии ингибиторов α7nAChR и ряда блокаторов кальциевых каналов (Fodero et al., 2004). Это позволяет рассматривать Ab-пептиды, как возможные агонисты α7nAChR. Помимо мономерных форм Аβ α7nAChR также взаимодействуют с его фибриллярными формами, и при накоплении последних может происходить блокада никотиновых рецепторов и нарушение синаптической передачи (Ni et al., 2013). С другой стороны, совсем недавно было установлено, что конститутивные клеточные белки прионы PrP^C являются рецепторами олигомерных форм Аβ (Laurén et al., 2009). Это подтверждает наличие связи между метаболизмом амилоидного пептида и прионов, предложенное ранее в работе Э. Паркина и коллег, которые показали участие PrP^C в протеолизе APP β-секретазой (Parkin et al., 2007). В развитие этих исследований было показано, что цитотоксичность олигомеров Аβ зависит от связывания PrP^C с липопротеиновыми рецепторами LRP1 в холестерин-обогащенных кластерах (так называемых липидных рафтах) клеточных мембран (Rushworth et al., 2013), что открывает перспективу терапевтической модуляции этого эффекта

посредством изменения липидного состава клеточных мембран, например при действии статинов (Barone et al., 2013).

2.4. Выведение Аβ из организма и мозга

Содержание Аβ в головном мозге намного выше, чем на периферии. Так, у пациентов, страдающих БА, среднее содержание $Aβ_{40}$ в цереброспинальной жидкости (ЦСЖ) составляет 9,7 нг/мл и только 0,14 нг/мл в плазме крови. Аналогично, содержание $Aβ_{42}$ в ЦСЖ составляет 0,61 нг/мл и только 0,009 нг/мл в плазме (Mehta et al., 2001). Почти 70-кратная разница между содержанием Аβ в ЦСЖ и плазме крови отражает специфический баланс его продукции и расщепления в ткани мозга по сравнению с периферическими органами и тканями. Основными органами, расщепляющими Аβ на периферии, являются печень, которая удаляет около 60% этого пептида из плазмы крови, и почки (Ghiso et al., 2004). В нормально функционирующем мозге накопление избыточных количеств Аβ регулируется за счет его постоянного оттока из внеклеточного пространства по периваскулярным путям, которое может быть нарушено в результате цереброваскулярных патологий (Weller et al., 2002), а также при действии протеолитических ферментов.

2.5. Амилоид-деградирующие ферменты

Несмотря на то что накопление Аβ в ткани мозга длительное время считалось необратимым процессом, сравнительно недавно было обнаружено существование эндогенных биохимических путей его деградации и удаления из ткани мозга (для обзора см. Nalivaeva et al., 2012c). Как было показано рядом авторов, некоторые хорошо известные протеазы мозга способны гидролизовать Аβ в физиологических условиях. Это привело к пересмотру имеющихся представлений о метаболизме амилоидного пептида. К числу основных амилоид-деградирующих ферментов сейчас относят неприлизин (НЕП), эндотелин-конвертирующий фермент (ECE-1), инсулин-деградирующий фермент (ИДФ; инсулизин) и плазмин, которые способны расщеплять Аβ как *in vitro,* так и *in vivo* (Nalivaeva et al., 2008, 2012a,b,c). На рис. 4 схематично показаны участки молекулы Аβ, на которых возможно его протеолитическое расщепление различными ферментами. Снижение уровня экспрессии или активности этих ферментов при патологических условиях может вести к накоплению Аβ и развитию БА или других нейродегенеративных патологий. С другой стороны, повышение экспрессии и активности амилоид-деградирующих ферментов как фармакологическими средствами, так и посредством генной терапии открывает новое направление в профилактике и терапии Аβ-опосредованной нейродегенерации и БА.

Неприлизин. Неприлизин (НЕП, нейтральная эндопептидаза-24.11) является цинкзависимой металлопептидазой, впервые описанной в ткани почек как фермент, деградирующий пептидные гормоны (см. обзор Turner, Tanzawa, 1997). Этот фермент также известен как энкефалиназа благодаря его способности расщеплять

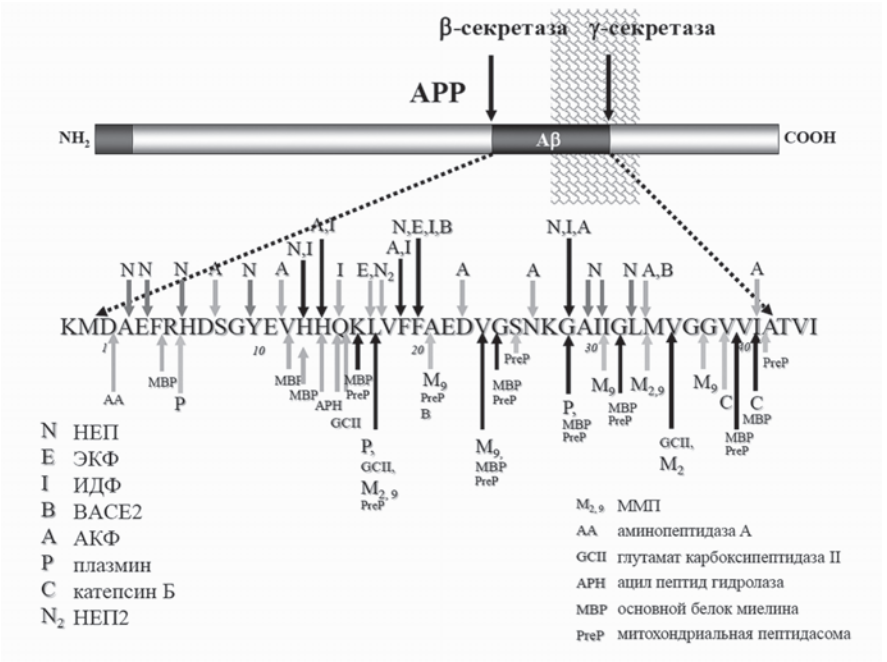


Рис. 4. Участки расщепления Аβ пептида амилоид-деградирующими ферментами

Аβ образуется из APP путем последовательного действия β- и γ-секретаз. Аβ пептиды, состоящие, как правило, из 40 или 42 аминокислотных остатков, расщепляются неприлизином (Н), эндотелин-конвертирующим ферментом (Е), инсулин-деградирующим ферментом (И), матричными металлопептидазами ММР-2, 3, 6 или 9 (М), плазмином (П), митохондриальной пептидазой PreP, а также рядом других ферментов, которые перечислены на рисунке

энкефалин и прерывать пептидергическую нейропередачу. НЕП представляет собой мембраносвязанный гликозилированный эктофермент с молекулярным весом 93 кДа, активный центр которого обращен во внеклеточное пространство. НЕП способен расщеплять пептидные связи внутри молекул низкомолекулярных пептидов по гидрофобным аминокислотным остаткам (Erdos, Skidgel, 1989). НЕП обладает довольно широкой субстратной специфичностью и регуляторной активностью. Благодаря этим свойствам НЕП принимает участие в регуляции разнообразных физиологических процессов, включая сердечно-сосудистую деятельность, воспалительные процессы, миграцию и пролиферацию клеток, а также развитие опухолей (Usmani et al., 2002; Nalivaeva et al., 2012c). Ключевая роль НЕП в деградации нейропептидов подтверждает возможную физиологическую роль Аβ, предложенную А.Р. Кудиновым и Т.Т. Березовым (Koudinov, Berezov, 2004), поскольку Аβ также является одним из физиологических субстратов НЕП. НЕП присутствует в головном мозге в относительно низких количествах. Так, например, если в ткани почек его содержание составляет 4% от общего содержания всех белков, то в ткани мозга его в 1000 раз меньше.

Способность НЕП расщеплять Аβ-пептиды делает его важным участником на арене исследований патогенеза БА (Iwata et al., 2004). Поскольку НЕП способен

расщеплять не только мономеры, но также олигомерные формы $A\beta_{(1-40)}$ и $A\beta_{(1-42)}$ (Kanemitsu et al., 2003), это его свойство является особенно важным для предотвращения образования более токсичных олигомерных форм Аβ пептида. В предварительных клинических исследованиях было показано, что содержание НЕП и его мРНК у пациентов с БА является достоверно более низким, чем у контрольных пациентов соответствующего возраста (Yasojima et al., 2001). В предпринятом недавно в Японии эпидемиологическом исследовании было показано существование корреляции между уровнем экспрессии гена НЕП и развитием старческой формы БА (Sakai et al., 2004a), однако другие исследователи не смогли выявить наличие такой корреляции (Lilius et al., 2003).

Неприлизин 2. Относительно недавно был обнаружен гомолог НЕП, названный НЕП2 (также известный как NL1 и SEP), экспрессия которого в головном мозге свойственна, в основном, развивающимся и дифференцирующимся областям ЦНС и комплиментарна распределению НЕП, присутствуя в ограниченных популяциях нейронов, в спинном мозге, гипофизе и сосудистом сплетении мозга (Facchinetti et al., 2003).У мышей НЕП2 также обнаружен в большинстве периферических органов, хотя преимущественным местом его локализации является тестис (Ghaddar et al., 2000). Важно отметить, что НЕП2 человека и грызунов (мышей и крыс) обладают разными паттернами экспрессии, ферментативными свойствами и чувствительностью к ингибиторам, что необходимо учитывать при экстраполяции данных, полученных на трансгенных мышах, для оценки функциональной роли этого фермента в ткани мозга человека (Huang et al., 2008; Whyteside, Turner, 2008). Анализ субстратной специфичности НЕП и НЕП2 человека показал, что они оба интенсивно расщепляют Аβ и НЕП2 обладает большим сродством к этому субстрату (Whyteside, Turner, 2008). Принимая во внимание характер распределения НЕП2 и его ферментативные особенности, предполагают, что он является важным амилоид-деградирующим ферментом и расширяет диапазон возможности клеток и тканей катаболизировать Аβ (Marr, Spencer, 2010). Недавние клинические исследования также выявили изменение уровня экспрессии НЕП2 в разных участках мозга при мягком когнитивном снижении, что позволяет рассматривать его в качестве одного из маркеров доклинической стадии БА (Huang et al., 2012).

Эндотелин-конвертирующий фермент. Другим кандидатом на роль амилоид-деградирующего фермента является эндотелин-конвертирующий фермент (endothelin-converting enzyme, ECE-1, ЭКФ). ECE-1 является мембраносвязанным белком, на 37% гомологичным по аминокислотной последовательности НЕП (в случае сравнения белков крысы). ECE-1 также является цинк-зависимой металлопротеазой и его основная физиологическая роль состоит в превращении большого эндотелина, в мощный вазоконстриктор эндотелин-1 (Xu et al., 1994).

ECE-1 был впервые изолирован из легких крыс, а затем обнаружен в большом числе органов и тканей (Takahashi et al., 1995). Наиболее обогащены этим ферментом эндотелиальные клетки, но он также экспрессируется в экзокринных клетках, мышцах, нейронах и глии (Barnes et al., 1997). В гладкомышечных клетках ECE-1 находится в комплексе с α-актиновыми филаментами. Сравнивая ECE-1 гетерозиготных и нокаутных мышей, Е.А. Экман и коллеги показали, что концентрация Аβ-

пептидов в их мозге существенно выше, чем у контрольных животных, и имеет ген-зависимый характер (Eckman et al., 2003). Как было показано этими авторами, растворимый рекомбинантный ECE-1 в условиях *in vitro* обладает способностью гидролизовать синтетические $A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$ на множественных участках (рис. 4).

Существует еще один белок, подобный ECE, который кодируется специфическим геном и носит название ECE-2 (Emoto, Yanagisawa, 1995). ECE-2, в основном, локализован в мозге и представлен незначительными количествами в эндотелиальных и гладкомышечных клетках. ECE-2 имеет 59% идентичности с ECE-1, но отличается от него кислотным pH-оптимумом, будучи практически неактивным при нейтральных pH. Он локализован в секреторных компартментах клеток где, вероятно, принимает участие в деградации белков. ECE-2, как и ECE-1, может катаболизировать Aβ, хотя оба этих фермента расщепляют разные его пулы – секретируемый и цитоплазматический (Pacheco-Quinto, Eckman, 2013).

Инсулин-деградирующий фермент. Еще одним ферментом, способным расщеплять Aβ, является цинк-зависимая металлопептидаза, инсулин-деградирующий фермент (ИДФ, инсулизин). ИДФ, в основном, локализован в цитозоле, но также обнаруживается в пероксисомах (Duckworth et al., 1998). Небольшие количества этого фермента находят в плазматических мембранах, а также во внеклеточной среде, хотя механизм секреции ИДФ пока не известен. Совсем недавно появились данные о том, что продукт альтернативной транскрипции ИДФ генерирует митохондриальную изоформу этого фермента, которая способна расщеплять некоторые митохондриальные белки (Leissring et al., 2004). ИДФ расщепляет субстраты предпочтительно по гидрофобным и основным остаткам аминокислот, однако этот процесс не является строго последовательность-специфичным (см. рис. 4). Он обладает способностью расщеплять *in vitro* широкий спектр физиологических субстратов и имеет другие физиологические функции помимо инсулинового метаболизма. Было высказано предположение, что специфичность ИДФ обуславливается конформацией субстрата и его размерами с предпочтением к более крупным молекулам (Duckworth et al., 1998). Как было показано, ИДФ обладает специфичностью к ращеплению Aβ, ассоциированного с семейными мутациями гена APP (Morelli et al., 2005).

Роль ИДФ в катаболизме Aβ была впервые предположена И.В. Курочкиным и С. Гото (Kurochkin, Goto, 1994) и исследовалась далее Д.Дж. Селко и коллегами (Qui et al., 1998). Принимая во внимание внутриклеточную локализацию ИДФ, было высказано предположение, что он может быть вовлечен в деградацию внутриклеточного Aβ. Гипотеза о том, что снижение активности ИДФ может вести к развитию БА, была поддержана работами А. Перез и коллег (Perez et al., 2000). Недавно выведенная линия трансгенных мышей, моделирующих БА (McGill-Thyl-APP), и характеризуемая значительным снижением экспрессии ИДФ на ранней преклинической стадии развития патологии, рассматривается сейчас как важный инструмент в изучении механизмов регуляции и восстановления активности этого фермента (Ferretti et al., 2011).

В сравнительном исследовании ими было показано существенное снижение активности ИДФ в мозге пациентов, страдающих БА, по сравнению с контрольными пациентами того же возраста. Напротив, повышенная экспрессия ИДФ, как и

НЕП, в нейронах мозга трансгенных мышей приводила к существенному снижению уровня секретируемого ими Аβ, препятствовала формированию амилоидных депозитов и связанной с ними цитопатологии, а также предотвращала преждевременную гибель APP-мутантных животных (Leissring et al., 2003). Тем не менее, интракраниальные инъекции адено-ассоциированных векторов (AAV), экспрессирующих НЕП или ИДФ трансгенным мышам, показали, что только НЕП-содержащий вектор действительно приводил к снижению амилоидной патологии (Carty et al., 2013), что снижает потенциал возможного применения ИДФ-векторов для терапии БА.

Помимо Аβ ИДФ также обладает способностью гидролизовать цитоплазматический фрагмент APP – AICD (Edbauer et al., 2002). Повышение экспрессии ИДФ в клетках как экстраневрального так и нейронального происхождения приводило к значительному снижению в них AICD. Тем не менее, при полном ингибировании ИДФ не наблюдалось существенного повышения уровня внутриклеточного AICD, что свидетельствует о наличии альтернативных путей его деградации.

В литературе имеются данные, связывающие патогенез БА с действием и патологией метаболизма инсулина (Gasparini, Xu, 2003), в связи с чем БА часто называют дабетом 3 типа (Kroner, 2009). Предполагается, что инсулин и инсулиноподобные факторы, которые играют определенную роль в обучении и памяти, также могут быть вовлечены в развитие патологических процессов, ведущих к БА (Dore et al., 1997). Более того, нарушение метаболизма глюкозы также является одним из характерных признаков БА (Bigl et al., 2003). Как было показано, экспрессия инсулиновых рецепторов повышена в мозге больных, страдающих БА, но имеет нарушенный сигнальный механизм (Hoyer, 2004). В опытах по рецепторному связыванию было обнаружено, что $Aβ_{(1-40)}$ и $Aβ_{(1-42)}$ снижают способность инсулина связываться со своими рецепторами, а также блокируют автофосфорилирование рецепторов. Напротив, обращенный пептид $Aβ_{(40-1)}$ не изменяет связывание инсулина с рецепторами и их автофосфорилирование. Это позволяет предположить, что $Aβ_{(1-40)}$ и $Aβ_{(1-42)}$ являются непосредственными конкурентными ингибиторами рецепторного связывания и действия инсулина (Xie et al., 2002).

Рядом авторов предполагается наличие общих механизмов развития гиперинсулинемии, диабета и БА. Так, с использованием генетически модифицированных линий мышей было показано, что полное отсутствие аллелей гена ИДФ (-/-) приводит более чем к 50-процентному снижению уровня катаболизма Аβ как в мембранных фракциях мозга, так и в первичных нейрональных культурах, полученных из мозга этих животных. При этом в печени этих животных также наблюдается пониженное расщепление инсулина (Farris et al., 2004). ИДФ (-/-) мыши помимо увеличенного накопления в ткани мозга эндогенного Аβ также демонстрировали гиперинсулинемию и нетерпимость к глюкозе, характерные для диабета второго типа. Эпидемиологические исследования также свидетельствуют в пользу того, что инсулин-независимый диабет второго типа связан с повышенным риском развития БА (Nicolls, 2004).

Генетические изменения внутри или вблизи гена ИДФ также связывают с увеличением риска и тяжести БА (Prince et al., 2003). В частности, на 10-й хромосоме был обнаружен большой участок (размером более 60 мегапар оснований), включа-

ющий ген ИДФ, который сопряжен с риском развития БА. Генетические изменения на этом участке ДНК позволили идентифицировать аллели риска развития БА с эффектом, сравнимым по своей значимости с мутацией аллели e4 аполипопротеина Е (Mahley et al., 2007). Однако генетические исследования в Японии и Франции не подтвердили наличия связи между полиморфизмом гена ИДФ и повышением вероятности возникновения как ранней, так и старческой форм БА (Sakai et al., 2004b). Напротив, другая группа исследователей (Blomqvist et al., 2004) обнаружили равновероятностное присутствие как нарушающих, так и протекторных аллелей гена ИДФ, связанных с патогенезом не только БА, но также и болезни Паркинсона.

Плазмин. Плазмин (ЕС 3.4.21.7) является сериновой протеиназой, образующийся из неактивного зимогена, плазминогена, в результате действия других сериновых протеаз, называемых активаторами плазминогена. Плазмин расщепляет многие компоненты внеклеточного матрикса и в плазме крови действует, в основном, как тромболитический фактор. В мозге плазминогеновая система вовлечена в многочисленные функции, такие как нейрональная пластичность, поддержание уровня нейротрофинов, функционирование холинергической системы, долгосрочная потенциация посредством деградации ламинина, обучение и память (Nakagami et al., 2000; Allard et al., 2012). При фокальной церебральной ишемии наблюдается активация плазминогеновой системы в мозге, сохраняющаяся в течение нескольких дней после инсульта, что предполагает ее участие в процессах деструкции внеклеточного матрикса, вторичных кровотечениях и отеке мозга (Pfefferkorn et al., 2000). Уровень плазмина также снижен в ткани мозга пациентов, страдающих БА, особенно в гиппокампе (Ledesma et al., 2000).

Роль плазмина в патогенезе БА пока полностью не ясна, хотя в литературе есть ряд наблюдений, свидетельствующих о способности плазмина катаболизировать амилоидный пептид (Van Nostrand, Porter, 1999). Так, было показано, что очищенный плазмин способен ращеплять Аβ с физиологически значимой эффективностью, равной 1/10 скорости расщепления им фибрина. При этом масс-спектрометрический анализ показал, что плазмин гидролизует Аβ в нескольких местах (см. рис. 4), а данные электронной микроскопии подтвердили, что плазмин способен расщеплять также Аβ фибриллы. Более того, экзогенно добавленный к клеткам плазмин способен блокировать нейротоксичность, вызванную Аβ (Tucker et al., 2000). Исследования ткани мозга трансгенных APP/PS1 мышей, у которых также отсутсвует ген ингибитора активатора плазминогена PAI-1, выявили более низкое содержание у них Аβ, что указывает на участие плазмина в его катаболизме (Liu et al., 2011).

В работе И.Б. Кингстона и коллег показано, что агрегированные формы Аβ *in vitro* способны стимулировать энзиматическую активность тканеспецифического активатора плазминогена (tPA) (Kingston et al., 1995). Образующийся в результате этого плазмин специфически расщепляет Аβ таким образом, что усиливаются его свойства к образованию β-складок и агрегации. Это, в свою очередь, ведет к дальнейшей стимуляции tPA и более усиленной продукции плазмина. Такой механизм обратной связи может играть отрицательную роль, поскольку избыточный протеолиз белков, вызванный активацией плазминогена, может вести к разрушению клеток сосудов головного мозга и кровоизлияниям (Van Nostrand, Porter, 1999).

Основным эндогенным ингибитором tPA в ткани мозга является белок нейросерпин, синтезируемый в нейронах. При БА в мозге имеет место повышение содержания нейросерпина и снижение активности плазмина (Fabbro, Seeds, 2009). При нокауте гена нейросерпина у трансгенных hAPP-J20 мышей, моделирующих БА, наблюдалось резкое снижение содржания $A\beta_{42}$, сопровождавшееся улучшением когнитивных функций, по сравнению с животными с активным геном нейросерпина (Fabbro et al., 2011). Однако, несмотря на многочисленные данные, свидетельствующие об участии плазминовой системы в катаболизме амилоидных отложений, другая группа исследователей не смогла выявить существенных изменений экспрессии плазминогена на уровне мРНК и белка в ткани мозга при БА (Barker et al., 2010). Но поскольку эти исследования проводились post mortem, интерпретация полученных данных должна проводиться с осторожностью. Другой группе исследователей также не удалось выявить различий в уровне содержания t-PA, плазминогена и PAI-1 в ЦСЖ больных и здоровых людей, хотя они не отвергают роли плазминонгеновой системы в расщеплении амилоида и патогенезе БА (Martorana et al., 2012).

В составе плазматических мембран плазмин находится в ассоциации с холестерин-обогащенными микродоменами, так называемыми липидными рафтами (Ledesma et al., 2003), которые считаются местами преимущественного образования амилоидного пептида (Cordy et al., 2003). Это также свидетельствует о наличии функциональной связи между плазмином, холестерином и метаболизмом Аβ (Ehehalt et al., 2003).

Рядом авторов было показано, что агрегированные формы Аβ также способны повышать уровень мРНК, кодирующих тканеспецифические активаторы плазминогена урокиназного типа (uPA) (Tucker et al., 2002), который тоже связывают с патогенезом БА. Как было показано в работах нескольких исследовательских групп, локус на хромосоме 10, связанный с фамильной формой БА, содержит в своем составе ген урокиназного активатора плазминогена (Ertekin-Taner et al., 2005). Эти авторы также продемонстрировали, что комбинация uPA и плазминогена вместе, но не по отдельности, ингибируют токсичность Аβ, снижая его фибрилогенез и формирование депозитов Аβ.

Поиск генетической связи между плазмином и риском развития БА пока не позволяет сделать однозначные заключения, хотя имеются данные, связывающие уровень содержания $A\beta_{42}$ с полиморфизмом гена активатора плазминогена урокиназного типа (*PLAU*) на хромосоме 10 и спорадической формой БА (Riemenschneider et al., 2006). В проведенном недавно исследовании (Shibata et al., 2005), сравнивающем 14 наиболее часто встречающихся вариаций генов, кодирующих компоненты плазминовой системы, не было подтверждено, что полиморфизм этих генов связан с частотой встречаемости БА.

Фармакологическая или генетическая регуляция плазминогеновой системы пока остается одной из возможных стратегий профилактики и лечения БА, поскольку плазмин способен эффективно удалять внутриклеточные мономерные и внеклеточные фибриллярные формы Аβ. Низкомолекулярные ингибиторы активатора плазминогена (PAI-1) могли бы эффективно поддерживать активность плазми-

новой системы на желательно высоком уровне. Однако, поскольку плазмин также вовлечен в метаболизм фибрина, создание такой терапии следует проводить с осторожностью во избежание побочных эффектов в виде кровотечений.

Ангиотензин-конвертирующий фермент. Ангиотензин-конвертирующий (ангиотензин-превращающий фермент, АКФ, ACE) является ключевым компонентом ренин-ангиотензиновой системы (РАС) как в ЦНС, так и на периферии. ACE регулирует кровяное давление и функции сердечно-сосудистой системы посредством превращения ангиотензина I в мощный вазоконстриктор ангиотензин II и одновременно посредством инактивации вазодилятора брадикинина. Наличие связи между ACE и патогенезом БА было показано в генетических исследованиях, а метаанализ данных литературы с еще большей убедительностью показал существование прямой связи между РАС, развитием гипертензии, гипоксией/ишемией мозга и БА (для обзора см. Kehoe, Wilcock, 2007). Полиморфизм гена *DCP* на хромосоме 17q13, кодирующего ACE, ассоциирован с высоким риском развития БА, особенно в случае инсерций или делеций (I/D) на участке интрона 16 (Lehman et al., 2005). Кроме этого существует связь между развитием старческой формы БА и полиморфизмом на других участках гена ACE (Kehoe et al., 2003). В этой связи встает закономерный вопрос о том, что определяет связь между БА и ACE: его свойства, связанные с РАС, или способность расщеплять Аβ. В отличие от НЕП и ИДФ, при БА уровень содержания и активность ACE в ткани мозга, в частности в гиппокампе, фронтальной коре и хвостатом ядре, значительно выше, чем в норме (Savaskan et al., 2001). Повышение активности ACE может непосредственно вести к когнитивным нарушениям в результате гиперпродукции ангиотензина II, который оказывает ингибирующий эффект на высвобождение ацетилхолина.

Как было показано Дж. Ху и соавторами (Hu et al., 2001), ACE способен расщеплять Аβ, а также ингибировать формирование его агрегатов и токсичность в условиях *in vitro*, и эти свойства ACE подавляются в присутствии его специфического ингибитора лизиноприла.

Амилоид-деградирующие свойства ACE были подтверждены в работе (Hemming, Selkoe, 2005), где было показано, что ACE расщепляет как $A\beta_{1-40}$, так и $A\beta_{1-42}$, и что ингибиторы ACE приводят к накоплению Аβ в APP-экспрессирующих клетках CHO. Более того, как оказалось, ACE способен превращать токсический $A\beta_{1-42}$ в менее патогенный $A\beta_{1-40}$ (Zou et al., 2007). Введение ACE ингибитора каптоприла трансгенным мышам Tg2576, используемым как модель БА, приводило к ускоренному накоплению в ткани мозга Аβ, в частности его более патогенной формы $A\beta_{1-42}$. Эти данные свидетельствуют, что умеренное повышение активности ACE может представлять терапевтическую ценность для терапии нейродегенерации и БА. С другой стороны, вызывает опасение, что длительное применение ингибиторов ACE для лечения гипертензии может повышать риск развития БА. В развитие этого предположения был проведен анализ изменений уровня Аβ на периферии и образования амилоидных отложений в ткани мозга, при использовании других ингибиторов ACE, которое не подтвердило это опасение (Hemming et al., 2007). Клиническое исследование большой группы пациентов в Японии (Ohrui et al., 2004) показало, что применение ACE-ингибиторов, способных проникать через

гематоэнцефалический барьер (например каптоприл) и ингибировать ACE в ткани мозга, коррелирует с более низким процентом развития БА, чем при применении ингибиторов, которые не способны ингибировать мозговую форму ACE (например лизиноприл). В связи с этим высказывается предположение о существовании связи между активностью ACE и развитием церебральной амилоидной ангиопатии, поскольку при этой патологии показано повышение уровня содержания и активности ACE, вероятнее всего нейронального происхождения, в периваскулярных районах мозга (Miners et al., 2008).

В литературе имеются убедительные данные о наличии генетической связи между полиморфизмом ACE и развитием спорадической формы БА (Katzov et al., 2004; Bertram, Tanzi, 2008). Более того, была показана связь между полиморфизмом этого гена и развитием мягкого когнитивного снижения амнестического типа (Zhang et al., 2012).

Матричные металлопротеиназы. Матричные металлопротеиназы (ММП) представляют собой еще один класс ферментов, которые в условиях *in vivo* могут катаболизировать не только APP, но и Aβ (см. рис. 4) (для обзора см. Kauwe et al., 2007). Так, было показано, что $A\beta_{1-40}$ является субстратом ММП-2 (желатиназы А), ММП-3 (стромелизина), ММП-6 и ММП-9 (желатиназы Б). Более того, Aβ способен повышать уровень экспрессии этих ферментов (Roher et al., 1994; Yoshiyama et al., 2000). Среди перечисленных ферментов ММП-9 является наиболее изученной в отношении специфичности к Aβ (Backstrom et al., 1996). Эти авторы показали связь между характером распределения ММП-9 и уровнем содержания Aβ и обнаружили присутствие этого фермента в непосредственной близости от амилоидных бляшек. ММП-9 *in vitro* способна расщеплять $A\beta_{40}$ на нескольких участках, но основным местом ее действия является связь между Leu(34) и Met(35) (см. рис. 4). ММП-2 и ММР-9 были также обнаружены в астроцитах, окружающих амилоидные отложения в мозге стареющих APP/PS1 и APPsw трансгенных мышей, где они, по-видимому, играют роль в расщеплении Aβ (Yan et al., 2006). ММП-9, как и плазмин, способна расщеплять не только мономерные, но и фибриллярные формы Aβ. Уровень ММПз и их способность расщеплять Aβ изменяется под воздействием различных факторов. Так, в условиях *in vivo* содержание Aβ может быть снижено путем добавления лиганда металлов кликинола и ионов меди (Cu^{2+}), которые повышают уровень экспрессии ММП-2 и ММП-3 (White et al., 2006), что может иметь определенное терапевтическое значение.

Несмотря на наличие убедительной связи между уровнем активности ММПз и амилоидным метаболизмом, в эпидемиологическом исследовании образцов мозга не было выявлено различий в уровне экспрессии и активности ММП-2, -3 и -9 во фронтальной коре при БА и в нормальном мозге (Baig et al., 2007). На генетическом уровне также не было показано наличие корреляций между полиморфизмом генов ММП-3 и ММП-9 и риском развития БА, хотя эти полиморфизмы были связаны с другими заболеваниями (Shibata et al., 2005). С другой стороны, у людей, не являющихся носителями ε4 аллели аполипопротеина Е, наблюдается меньший риск развития БА, связанный с определенными полиморфизмами ММР-3 и ММП-9 (Helbecque et al., 2007). Более того, недавно было показано, что защитные эффекты

эстрогенов против амилоидной токсичности обусловлены активацией ММП-2 и -9 и соответствующим повышением катаболизма Аβ (Merlo, Sortino, 2012).

Катепсин В. За последние годы накоплено довольно большое число данных о роли лизосомальной сериновой протеиназы, кетепсина В, в метаболизме APP и Аβ пептида. Этот фермент был предложен в качестве альтернативной β-секретазы, действующей преимущественно на нативные (генетически не модифицированные, как в случае семейных форм БА) молекулы APP (Wang et al., 2012). Также было показано, что ингибиторы катепсина В снижают когнитивный дефицит и понижают содержание Аβ в мозге мышей с моделированием БА (Hook et al., 2010). Это согласуется с данными исследований, свидетельствующих, что нейропротекторные свойства катепсина В обусловлены его способностью расщеплять Аβ, в частности $Aβ_{42}$. Напротив, на модели катепсин В-трансгенных мышей, лишенных этого гена и экспрессирующих APP человека с семейными мутациями, было показано повышение накопления $Aβ_{42}$, сенильных бляшек и когнитивный дефицит (Mueller-Steiner et al., 2006). Также недавно было установлено, что катепсин В способен расщеплять С-концевые фрагменты APP, в том числе и AICD, что указвыает на участие эндосомально-лизосомной системы в метаболизме APP и его фрагментов (Asai et al., 2011).

Действие катепсина В на $Aβ_{42}$ сходно с таковым у ACE, поскольку он проявляет активность дикарбоксипептидазы с оброазованием сначала $Aβ_{40}$, а потом $Aβ_{38}$, тем самым снижая токсичность амилодного пептида (Mueller-Steiner et al., 2006). В результате эндопептидазной активности катепсина В также образуется $Aβ_{33}$. Этот фермент также способен расщеплять олигомеры Аβ и его фибриллы и действовать как внутри нервных клеток (в лизосомах), так и снаружи, поскольку он интенсивно секретируется активированной микроглией, в частности в ответ на действие Аβ (Wu et al., 2013). В связи со сложившимися представлениями о роли катепсина В в расщеплении амилоидного пептида было высказано предположение, что повышения его активности в ткани мозга можно добиться путем инактивации его эндогенных ингибиторов, в частности цистатина С. Действительно, при нокауте гена цистатина 3 (*CST3*) у hAPP-J20 трансгенных мышей наблюдалось значительное снижение уровня растворимого Аβ, в частности $Aβ_{42}$, и сенильных бляшек. Удаление гена цистатина С приводило не только к нормализации Аβ-ассоциированного когнитивного дефицита и нарушений в поведении, но также к восстановлению синаптической пластичности в гиппокампе (Sun et al., 2008). К удивлению, оверэкспрессия цистатина С у трансгенных hAPP-J20 мышей также приводила к снижению уровня сенильных бляшек, но, как оказалось, это осуществлялось по механизму, не связанному с активностью катепсина В, а путем взаимодействия цистатина С непосредственно с самим Аβ, что препятствовало образованию его токсичных олигомеров и фибрилл (Kaeser et al., 2007; Mi et al., 2007).

Генетические исследования показали наличие связи между полиморфизмом гена цистатина С, который снижает его секрецию, и риском развития спорадической формы БА, что явилось первым свидетельством наличия аутосомно-рецессивной аллели, связанной с риском развития этой формы БА (Crawford et al., 2000). Позднее это было подтверждено данными системного метаанализа (Bertram et al., 2007). Исследования катепсина В и цистатина С указывают на важность анализа

как каждого индивидульного фермента, так и системы его эндогенных ингибиторов для регуляции метаболизма Аβ. Это позволит с большей точностью идентифицировать наиболее перспективные терапевтические мишени для профилактики и лечения БА с минимальными побочными эффектами.

Другие ферменты. Несмотря на довольно широкий спектр амилоид-деградирующих ферментов, обнаруженных к настоящему времени, их число продолжает расти. Еще одним физиологически значимым кандидатом на эту роль является пептидасома PreP (Falkevall et al., 2006), которая регулирует уровень содержания Аβ в митохондриях. PreP является родственной по свойствам, но не идентичной ИДФ, и принимает участие в расщеплении различных коротких митохондриальных пептидов, в том числе и Аβ на нескольких участках его молекулы (см. рис. 4). При БА и у трансгенных мышей в митохондриях клеток мозга наблюдается накопление Аβ, что приводит к снижению активности митохондриальных ферментов и угнетению функций митохондрий. Накопление Аβ в митохондриях, в основном в его более патогенной форме $Aβ_{42}$, наблюдается задолго до образования внеклеточных отложений амилоидных фибрилл и является возможной причиной изменения клеточных функций и их гибели при БА (Caspersen et al., 2005). Хотя до настойщего времени не было выявлено никаких ассоциаций между полиморфизмами гена PreP и риском развития БА, пониженная протеолитическая активность PreP была отмечена в митохондриях мозга при БА по сравнению с контролями того же возраста (Alikhani et al., 2011).

Совершенно неожиданно среди потенциальных кандидатов на роль амилоид-деградирующих ферментов оказался основной белок миелина (MBP) (Liao et al., 2009), который, как полагают, обладает эндогенной активностью сериновых протеаз, приводящей к аутокаталитическому расщеплению его белковой молекулы. Как было показано, MBP также способен связываться с Аβ, предотвращая его агрегацию (Hoos et al., 2009).

К числу ферментов, которые могут представлять терапевтический интерес для нейропротекции, также относят цинк-зависимую эндопептидазу, аминопептидазу А (АР-А). Этот фермент специфично удаляет N-концевые аминокислотные остатки и играет важную роль в центральной регкуляции кровяного давления посредством превращения ангиотензина II в ангиотензин III. Поскольку содержание укороченных с N-конца молекул Аβ, в частности $Aβ_{2-42}$, существенно повышено при БА и они обладают высокой токсичностью (Wiltfang et al., 2001), снижение активности АР-А может быть терапевтически выгодно. С другой стороны, при действии АР-А образуется субстрат другой аминопептидазы (АР-N), действие которой приводит к доступности остатка N-концевого глутамина для циклизации при участии глутаминил-циклазы, продукты которой тоже очень токсичны (Schilling et al., 2008). Инактивация АР-А, таким образом, может иметь нейропротекторный характер, препятствуя инициации каскада протеолитических реакций, высвобождающих целый ряд токсичных N-трункированных форм амилоидного пептида.

Еще одна полифункциональная цинк-зависимая эктопептидаза, а именно глутамат-карбоксипептидаза II (GCP II), в ткани мозга приводит к расщеплению широко распространенного нейротрансмиттера N-ацетил-аспартил-глутамат (NAAG). Последний, как было показано, вовлечен в патогенез ряда неврологических состо-

яний, и ингибиторы этого фермента имеют нейропротекторные свойства (Neale et al., 2011). В мозге человека этот фермент вырабатывается в основном в астроцитах (Šácha et al., 2007) и, как было показано, способен расщеплять $A\beta_{40}$ и $A\beta_{42}$ с образованием $A\beta_{1-14}$, $A\beta_{1-18}$ и $A\beta_{1-35}$, которые не обладают токсичностью. Введение специфического ингибитора GCPII трансгенным мышам, моделирующим БА, приводило к повышению уровня Аβ. Напротив, повышение экспрессии GCP II в нейронах и глии способствовало снижению образования Аβ и его токсичности. Это позволяет рассматривать GCP II как еще одного функционального участника контроля за уровнем накопления Аβ в условиях *in vivo*. Более того, этот фермент способен снижать уровень не только мономерных, но и олигомерных форм Аβ и его фибрилл, а также сенильных бляшек (Kim et al., 2010), что позволяет рассматривать его как потенциально важную терапевтическую мишень, хотя более детальные клинические исследования еще ждут своего проведения.

Другие агенты неферментативной природы. Нет никаких сомнений в том, что помимо классических протеолитических ферментов существуют и другие агенты, способные ускорять катаболизм Аβ *in vivo*. Например, было показано, что два фрагмента легких цепей антител также обладают протеолитической активностью по отношению к Аβ (Rangan et al., 2003). Первый из них демонстрирует активность, подобную α-секретазе (c23.5), и ведет к образованию 1–16 и 16–40 фрагментов Аβ (см. рис. 4). Второй фрагмент обладает карбоксипептидазной активностью, отщепляя последовательно по одной аминокислоте от С-концевой части молекулы Аβ. В дополнение к этому, расщепление $A\beta_{40}$ фрагментом легкой цепи антител hk14 приводит к изменению его агрегационных свойств и нейтрализует цитотоксический эффект Аβ (Liu et al., 2004). Напротив, расщепление $A\beta_{40}$ фрагментом легкой цепи антител c23.5 ведет к увеличению скорости агрегации образующихся продуктов, не увеличивая при этом их токсичность в условиях *in vivo*. Результаты этих исследований свидетельствуют, что фрагменты антител способствуют протеолитической деградации Аβ и, таким образом, имеют потенциальную терапевтическую значимость для контроля уровня образования, агрегации и токсичности Аβ в условиях *in vivo*. С другой стороны, эти данные заставляют с осторожностью относиться к предлагаемому методу контролируемого образования Аβ путем повышения активности α-секретазы, поскольку это может вести к увеличению агрегационных свойств амилоидного пептида с образованием более токсичных олигомеров.

Еще одним фактором, способствующим снижению уровня эндогенного Аβ, является глюкагонподобный пептид (GLP-1) (Perry, Greig, 2004). Локализация рецептора GLP в головном мозге человека и грызунов коррелирует с центральной ролью этого пептида в регуляции потребления пищи, однако также было показано, что стимуляция нейрональных GLP-1-рецепторов регулирует нейрональную пластичность и выживаемость нейронов. GLP-1 является естественным аналогом экзендина-4, который, как было установлено, снижает уровень эндогенного Аβ в паренхиме мозга мышей и уровень APP в нейронах. Поскольку GLP-1 активирует рецепторы, сопряженные с G_s белками, его действие посредством индукции синтеза цАМФ, может влиять на многие функции клетки, в том числе на их выживаемость. Это делает GLP-1 и другие агонисты рецепторов 2 класса, сопряженных с

G-белками, потенциально важными агентами для развития новых стратегий лечения БА (Martin et al., 2005).

Помимо ферментов в поддержании амилоидного гомеостаза в ткани мозга принимают также участие белки-переносчики, которые способны связывать и выводить Аβ по периваскулярным путям. К их числу относятся аполипопротеины (ApoE), связь которых с патогенезом БА уже рассматривалась выше, но точный механизм действия которых пока не установлен (для обзора см. Zlokovic, 2013), а также переносчик тироксина – транстиретин (TTR) (Du et al., 2012). Последний представляет особый интерес, поскольку его регуляция в нервных клетках осуществляется сходным с неприлизином образом (Kerridge et al., submitted). TTR, в основном образуется в сосудистом сплетении мозга (Sousa et al., 2007), но он также может экспрессироваться и нервными клетками (Li et al., 2010). В литературе есть указание на то, что TTR может проявлять пептидазную активность, но функциональный вклад этого белка в качестве фермента в катаболизм Аβ еще нуждается в подтверждении (Costa et al., 2008). Тем не менее, имеются убедительные данные о роли TTR в защите нервных клеток от повреждающего действия Аβ и восстанавлении когнтитивных свойств у животных (Buxbaum et al., 2008; Brouillett et al., 2012). С возрастом и при БА уровень TTP в ткани мозга существенно снижается (Tsai et al., 2009), что указывает на актуальность изучения механизмов регуляции его экспрессии, а также поиск соединений, способствующих нормализации его функций.

2.6. Динамичность уровня содержания Аβ

Как видно из приведенных выше литературных данных, амилоидный метаболизм является комплексным процессом, включающим многочисленные звенья, регулирующие образование, расщепление и выведение Аβ из мозга и организма. Широкая локализация ферментов, способных деградировать Аβ, позволяет контролировать его концентрацию как внутри нейронов и глии, так и в местах синапсов, вдоль нервных окончаний и во внеклеточной среде. Более того, процесс расщепления и выведения Аβ может происходить в районе сосудистого сплетения и нейроваскулярных единиц (ElAli, Rivest, 2013). Это должно обеспечивать мозгу надежную естественную защиту против накопления нежелательно высоких концентраций Аβ и предотвращать связанные с этим нейродегенеративные изменения. Однако в течение жизни, начиная с внутриутробного периода, организм подвержен действию многочисленных факторов, влияющих на развитие и функционирование этой системы и ведущих к модуляции метаболизма Аβ и его патологическому накоплению в ткани мозга.

3. Факторы, влияющие на метаболизм Аβ

Возраст. Старение нормально функционирующего мозга сопровождается многочисленными изменениями морфологических и биохимических свойств составляющих его структур и как следствие – их функций. Гибель нейронов и нарушение

нейрональных сетей приводит к ухудшению памяти и снижению способности к обучению, которые свойственны пожилому возрасту. В случае патологических нарушений биохимических процессов, протекающих в нервной ткани, происходит развитие различных нейродегенеративных заболеваний, имеющих как общие, так и специфические черты и способствующих ускорению процессов старения и гибели мозга и организма в целом. Морфологически разные структуры мозга также меняются с возрастом по-разному. Так, например, при нормальном старении мозга происходит атрофия гиппокампа, обуславливающая умеренное нарушение памяти. Степень атрофии гиппокампа находится в прямой зависимости от возраста и выражена сильнее у мужчин, чем у женщин (Golomb et al., 1993). Поскольку высшие функции мозга зависят от координированного действия разных участков мозга, нарушение связывающих их нейрональных цепей с возрастом также приводит к существенным изменениям когнитивных функций. В частности, детальный анализ свидетельствует о существовании определенных паттернов таких возрастных изменений в белом веществе мозга даже при нормальном старении, что отражается на поведении (Bennett, Madden, 2013).

В ходе старения организма и мозга в них происходит снижение скорости метаболических процессов, в частности, обмена глюкозы и связанных с этим изменений энергетических процессов (для обзора см. Chen, Zhong, 2013). Нарушение липидного обмена и накопление продуктов перекисного окисления липидов, являющихся токсичными для нервных клеток, также характерны для тареющего мозга. Имеются данные, свидетельствующие о корреляции между уровнем содержания в мозге продуктов перекисного окисления липидов и патогенезом БА (Montine et al., 2002; Lagouge, Larsson, 2013). Старение мозга многие ученые связывают с нарушением гомеостаза кальция, а выдвинутая ими теория «кальциевого старения мозга» связывает процессы угасания когнитивных способностей мозга со снижением синаптической пластичности нервных клеток. В обзоре (Toescu, Verkhratsky, 2004) проведен анализ накопленных к настоящему моменту данных, свидетельствующих, что изменения функций мозга прямым образом связаны с изменением метаболического статуса стареющих нейронов и их кальциевого гомеостаза, и в данном контексте первостепенное значение имеет нарушение функций митохондрий. Накопление Аβ в стареющем мозге, и в частности в митохондриях, является одним из факторов, ведущим к нарушению функций нейронов.

Мембраны клеток мозга пациентов, страдающих болезнью Альцгеймера, характеризуются достоверно более низкими концентрациями холестерина и в связи с этим аномальным составом липидных рафтов, что ведет к потере части связанных с этими липидными доменами функционально активных белковых комплексов, в частности плазминоген-связывающих и активирующих молекул. При БА также наблюдается низкий уровень содержания холестерина в белом веществе мозга без изменения в нем общего содержания жирных кислот (Roher et al., 2002). С использованием современных методов липидных исследований (shotgun lipidomics) было проведено сравнительное исследование более 800 видов липидных молекул из ткани мозга при БА и обнаружено существенное снижение уровня сфингомиелина (также одного из основных компонентов липидных рафтов) и увеличение церами-

дов по сравнению с контролем (Han et al., 2011). Также в более ранних исследованиях было показано существенное снижение уровня ганглиозидов в различных структурах мозга в ходе старания и при развитии БА (Kracun et al., 1991).

Как было показано с использованием культур фибробластов человека, метаболизм APP существенно изменяется с возрастом, что выражается в снижении образования его нейропротекторных фрагментов sAPPα и sAPPβ. Это является как следствием изменения уровня экспрессии самого APP, процессов его гликозилирования и транспорта, так и снижением содержания пресенилинов и BACE. Вместе с изменением состава клеточных мембран, и особенно холестерина, это ведет к существенным сдвигам в амилоидном метаболизме (Kern et al., 2005).

Характер накопления Аβ в ходе старения и при амилоидной ангиопатии мозга, а также места накопления сенильных бляшек при БА предполагают, что при этих патологиях нарушается отток Аβ через капилляры и более крупные сосуды мозга, вокруг которых и локализуются амилоидные депозиты (Hawkes et al., 2013). Это может быть следствием снижения активности периартериальных и лептоменингиальных путей оттока интерстициальной жидкости вследствие старения церебральных артерий и накопления в них холестерина. Поскольку риск развития БА существенно повышен у пациентов с цереброваскулярными нарушениями, любые средства их предупреждения и терапии, ведущие к нормализации выведения Аβ и других токсичных метаболитов из ткани мозга, также рассматриваются как перспективное направление в клинической неврологии. Важно отметить, что при развитии терапии БА с помощью вакцин против Аβ необходимо учитывать как скорость их доставки в различные участки мозга вследствие нарушения мозгового кровообращения, так и снижение скорости удаления Аβ и его фрагментов из ткани мозга пожилых людей (Weller et al., 2002).

Еще одним важным процессом в развитии связанных со старением патологий является нарушение посттрансляционных модификаций белков, приводящее к формированию нефункциональных структурных белков и ферментов. Большое число белков и ферментов также являются субстратами окислительных процессов, и накопление их окисленных производных действительно имеет место в мозге пациентов с БА (Butterfield et al., 2002). Данные ряда авторов свидетельствуют, что 4-гидроксиноненал (HNE), являющийся побочным продуктом перекисного окисления липидов, может образовывать ковалентные связи с белками по их гистидиновым и лизиновым аминокислотным остаткам, и содержание таких модифицированных белков в мозге повышено при БА. Подобная модификация функционально активных соединений, например переносчика глутамата, ведет к существенному нарушению функционирования клеток и рассматривается некоторыми авторами как один из факторов цитопатологии, наблюдаемой при БА (Lauderback et al., 2001). HNE-модифицированные белки обнаружены у таких пациентов не только в патологических нейронах, содержащих нейрофибриллярные клубки, но также и в нормально выглядящих пирамидальных нейронах (Sayre et al., 1997). Как было показано, НЕП также подвергается с возрастом HNE-модификации, и содержание окисленного и HNE-модифицированного НЕП у больных, страдающих болезнью Альцгеймера, выше, чем у пациентов контрольной возрастной группы (Wang et al., 2003).

В процессе старения и при развитии БА наблюдается существенный дефицит активности амилоид-деградирующих ферментов и эти изменения носят селективный характер в зависимости от структурной и клеточной локализации исследуемых ферментов. Так, например, с возрастом уровень экспрессии НЕП существенным образом снижается в коре и гиппокампе, но практически не изменяется в стриатуме, и именно в этой структуре не наблюдается формирования амилоидных депозитов (Iwata et al., 2002; Nalivaeva et al., 2003, 2004). Уровень ИДФ также в большей степени снижается с возрастом в гиппокампе и при БА является более окисленным по сравнению с мозжечком (Caccamo et al., 2005). Однако вокруг сенильных бляшек уровень экспрессии ИДФ оказывается повышенным, что, возможно, является отражением активации защитных, компенсаторных механизмов, обеспечивающих расщепление амилоидных олигомеров, высвобождающихся из амилоидных отложений (Leal et al., 2006). Это согласуется с данными других авторов, показавших повышение уровня экспрессии НЕП в реактивной астроглии вокруг сенильных бляшек (Apelt et al., 2003), а также в ответ на повышение содержания $A\beta_{42}$ (Mohajeri et al., 2002) и гипоксию (Fisk et al., 2006). Таким образом, у клеток мозга есть механизмы, способные приводить к повышению уровня экспрессии амилоид-деградирующих ферментов, что заслуживает более детального изучения и является в настоящее время одной из интенсивных областей научных исследований (Nalivaeva et al., 2012c).

Гипоксия и ишемия мозга. В настоящее время не вызывает сомнений, что нарушение мозгового кровообращения и обусловленные ими ишемия и гипокия мозга являются одними из основных факторов, повышающих риск развития васкулярной деменции и БА (Roher et al., 2012). Так, частота развития БА у пациентов, перенесших инсульты, намного выше, чем в других обследованных группах (Di Legge, Hachinski, 2003). Гипоксия и ишемия мозга являются одними из наиболее часто встречаемых патологий и возникают как в результате нарушения снабжения мозга кислородом при патологии кровообращения, так и вследствие изменения факторов окружающей среды. Гипоксия мозга может иметь место на любых этапах развития и жизнедеятельности человека и животных, и ЦНС особенно чувствительна к ее действию (Самойлов, 1985).

Метаболизм амилоидного пептида при гипоксии и ишемии изменяется довольно существенным образом как на уровне экспрессии APP, так и его расщепления секретазами (Webster et al., 2004). Амилоид-деградирующие ферменты также являются весьма чувствительными к изменению уровня содержания кислорода и окислительному стрессу, и экспрессия их генов существенно снижается при гипоксии и ишемии (Fisk et al., 2006, 2007). Как было показано в наших исследованиях, выполненных в рамках программы РАН «Фундаментальные науки медицине», у животных, подвергавшихся действию как пренатальной, так и постнатальной гипоксии, а также при ишемии мозга наблюдается повышение уровня экспрессии APP и снижение уровня активности неамилоидогенной α-секретазы, проявляющееся в снижении содержания нейропротекторной формы sAPPα (Nalivaeva et al., 2003, 2004; Журавин и др., 2007). На модели ишемии нами также было показано, что нарушение снабжения тканей мозга (например гиппокампа) кислородом ведет к

повышению активности амилоидогенной β-секретазы (Наливаева и др., 2005). У крыс, перенесших пренатальную гипоксию, уровень экспрессии НЕП и его аналога ECE-1 как в коре, так и стриатуме существенно ниже по сравнению с контрольными животными, что может вести к дефициту данных амилоид-деградирующих ферментов в постнатальном онтогенезе и увеличивать риск развития нейродегенеративных заболеваний (Nalivaeva et al., 2004; Дубровская и др., 2009). У этих животных также снижена пластичность нервной системы и наблюдается когнитивный дефицит (Журавин и др., 2011; Dubrovskaya et al., 2012). Результаты наших исследований поддерживают гипотезу о том, что перенесенные в раннем возрасте заболевания и стрессы запускают каскад реакций, в том числе на генетическом уровне, которые предопределяют развитие БА в зависимости от действия факторов окружающей среды, включая образ жизни, диету и гормональный статус (Lahiri et al., 2008).

В целом, данные литературы убедительно свидетельствуют о том, что гипоксия и ишемия ведут к сдвигу процессов амилоидного метаболизма в сторону накопления амилоидного пептида, и в связи с этим нарушение мозгового кровообращения является фактором риска развития БА. Среди методов профилактики патогенного действия гипоксии и, возможно, ишемии гипоксическое прекондиционирование может оказаться довольно перспективным, поскольку в наших исследованиях показано, что оно способно предотвращать изменение уровня экспрессии амилоид-деградирующих ферментов, а также ферментов, катаболизирующих APP по неамилоидогенному пути (Nalivaeva et al., 2004; Rybnikova et al., 2012).

4. Регуляция свойств амилоид-деградирующих ферментов

Как уже отмечалось выше, изучение регуляции экспрессии и активности амилоид-деградирующих ферментов и поиск путей их повышения является сейчас одним из перспективных направлений в области профилактики и терапии БА. Одним из приемов является повышение уровня экспрессии НЕП и других амилоид-деградирующих ферментов с помощью вирус-направленной доставки генов этих ферментов в структуры мозга, где наблюдается дефицит их активности. С использованием как адено-, так и лентивирусных векторов ряду авторов удалось добиться повышения активности НЕП и, соответственно, снижения уровня содержания Aβ в клетках мозга трансгенных мышей (Marr et al., 2003; Carty et al., 2013; Park et al., 2013). Хотя генная терапия является перспективным подходом, альтернативные методы повышения активности амилоид-деградирующих ферментов могут оказаться более доступными и менее дорогостоящими. Так, например, Т. Саито и соавторы предложили путь повышения уровня экспрессии НЕП с помощью его субстратов, используя механизм обратной связи. Среди таких соединений наиболее перспективным оказался соматостатин (Saito et al., 2005). В наших исследованиях было показано, что другой субстрат НЕП, а именно синтетический агонист опиоидных рецепторов DAGO, также способен повышать уровень экспрессии и активности НЕП и ЭКФ в нейрональных клетках (Журавин и др., 2007). Также весьма перспек-

тивным является применение природных антиоксидантов, в частности катехинов зеленого чая, которые способны активировать НЕП (Melzig, Janka, 2003; Журавин и др., 2007). Эффективными с точки зрения повышения активности ИДФ являются такие биологически активные соединения, как тиазолидиндион розиглитазон, а также динорфин В-9 (Pedersen et al., 2006). Согласно нашим исследованиям, синтетические геропротекторные пептиды вилон и эпиталон также способны повышать уровень экспрессии НЕП и ИДФ и предотвращать их снижение, вызванное гипоксией (Козина и др., 2008). Эти пептиды также оказывают влияние на активность и секрецию АХЭ и БуХЭ и активность α-секретазы (Наливаева и др., 2011).

Новым направлением на пути создания средств, повышающих уровень экспрессии НЕП и непосредственно связанных с продуктами метаболизма APP, является обнаруженный Шеклером и соавторами принцип регуляции гена НЕП С-концевым фрагментом APP, AICD (Pardossi-Piquard et al., 2005). Наличие такого эндогенного механизма обеспечивает клеткам возможность повышения уровня экспрессии амилоид-деградирующих ферментов при повышении скорости образования Аβ из APP при действии γ-секретазы. Хотя детальный механизм действия AICD пока полностью не изучен, нами было показано, что в клетках нейробластомы NB7, имеющих высокий уровень экспрессии НЕП, AICD непосредственно связан с промотором его гена, и транскрипционный фактор Fe65 принимает участие в этом взаимодействии (рис. 5) (Belyaev et al., 2009). Дальнейшие исследования показали, что транскрипционно активный AICD, способный повышать уровень экспрессии НЕП, образуется только из нейрональной изоформы APP_{695} в процессе его амилоидогенного расщепления β- и γ-секретазами (Belyaev et al., 2010). Свои регуляторные свойства

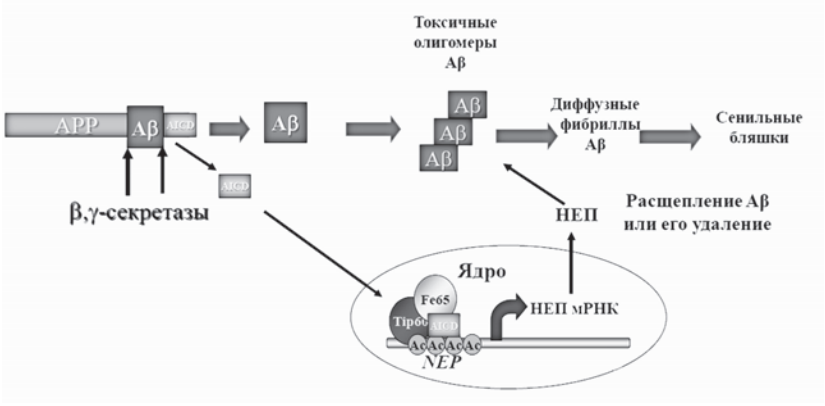


Рис. 5. Схема регуляции гена НЕП при участии С-концевого фрагмента APP (AICD), образующегося при его амилоидогенном расщеплении

В результате амилоидогенного расщепления APP при последовательном действии β- и γ-секретаз образуется Аβ, который способен образовывать олигомеры и в комплексе с другими белками входит в состав сенильных бляшек. Образующийся в этом же процессе С-концевой фрагмент AICD транслоцируется в ядро и в составе комплекса со стабилизирующим белком Fe65 и гистонацетилтрансферазой Tip60 связывается с промотором гена НЕП, запуская его экспрессию и приводя к расщеплению Аβ. Данный механизм является примером регуляции по принципу обратной связи и обеспечивает клеткам способность удалять излишки образующегося пептида

AICD, вероятнее всего, выполняет посредством связывания с субъединицей Med12 РНК-полимеразного комплекса (Xu et al., 2011). Как оказалось, совершенно сходным образом происходит регуляция и гена транстиретина (TTP) (Kerridge et al., submitted). В процессе связывания AICD с промоторами генов НЕП и TTP происходит конкурентное замещение присутствующих там гистондеацетилаз HDAC1 и HDAC3 и изменение характера ацетилирования гистонов хроматина (рис. 6). Ингибиторы гистондеацетилаз (в частности вальпроат натрия) также оказались способными в существенной степени повышать экспрессию НЕП (Belyaev et al., 2009) и восстанавливать снижение его активности, вызванное гипоксией (Nalivaeva et al., 2012b). Инъекции вальпроата натрия также восстанавливали плотность синаптических контактов и устраняли нарушения памяти, вызванные пренатальной гипоксией (Журавин и др., 2011). На модели трансгенных мышей, моделирующих БА, было подтверждено, что инъекции вальпроата натрия приводят к снижению накопления депозитов Aβ в ткани мозга и восстановлению когнитивного дефицита (Qing et al., 2008). В этой связи также необходимо упомянуть, что введение вальпроата натрия действительно изменяет характер ацетилирования гистонов хроматина нервных клеток (Yildirim et al., 2003), а ряд психических нарушений, например при алкоголизме, характеризуются изменениями организации хроматина (Pandey et

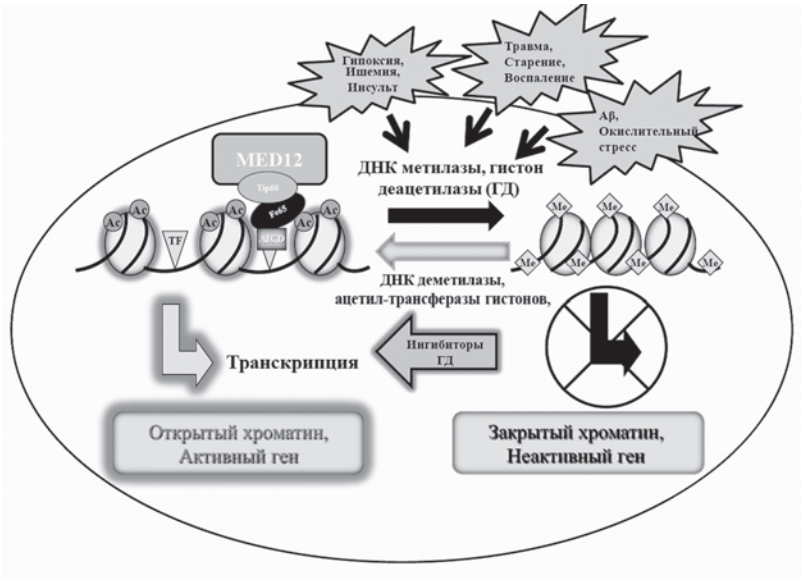


Рис. 6. Эпигенетическая регуляция экспрессии нейрональных генов

Уровень экспрессии генов регулируется при помощи модификации основных компонентов хроматина – ДНК и гистонов. Ацетилирование гистонов и деметилирование ДНК приводят к образованию открытой конформации генов, способствующей транскрипции. Напротив, метилирование ДНК и деацетилирование гистонов приводят к образованию закрытой конфигурации генов и прекращению транскрипции. В ходе развития и функционирования организма многочисленные факторы, в том числе ингибиторы гистондеацетилаз (например вальпроат натрия) влияют на конформацию хроматина и уровень активности генов. Med12 – компонент РНК-полимеразного комплекса, с которым связывается AICD, приводя к повышению экспрессии ряда генов, включая НЕП (Xu et al., 2011)

al., 2008). В совокупности эти данные позволяют предположить, что изучение изменений в структуре хроматина клеток нервной ткани в процессе старения и при развитии нейродегенеративных заболеваний является еще одним перспективным направлением в исследовании патогенеза БА и создании адекватных средств его профилактики и лечения (см. рис. 6).

5. Заключение

В заключение этой главы следует подчеркнуть, что понимание молекулярных механизмов патогенеза БА, и в частности метаболизма, предшественника амилоидного пептида, позволяет расширить сложившиеся на сегодняшний день представления о причинах возникновения этого нейродегенеративного заболевания, на развитие которого влияют многочисленные внешние и внутренние факторы и в патогенез которого вовлечены множественные метаболические процессы (рис. 7). Их углубленное изучение открывает новые терапевтические направления коррекции биохимических процессов, нарушенные в ходе развития и жизнедеятельности организма и приводящие к развитию патологии. В данном контексте важно отметить, что направленная регуляция экспрессии и активности амилоид-деградирующих ферментов может быть оправданным и недорогим способом профилактики БА. В частности, даже незначительное одновременное повышение активности нескольких амилоид-деградирующих ферментов может препятствовать накоплению токсических концентраций амилоидного пептида и предотвращать запуск каскада патологических реакций, ведущих к нейропатологии и БА.

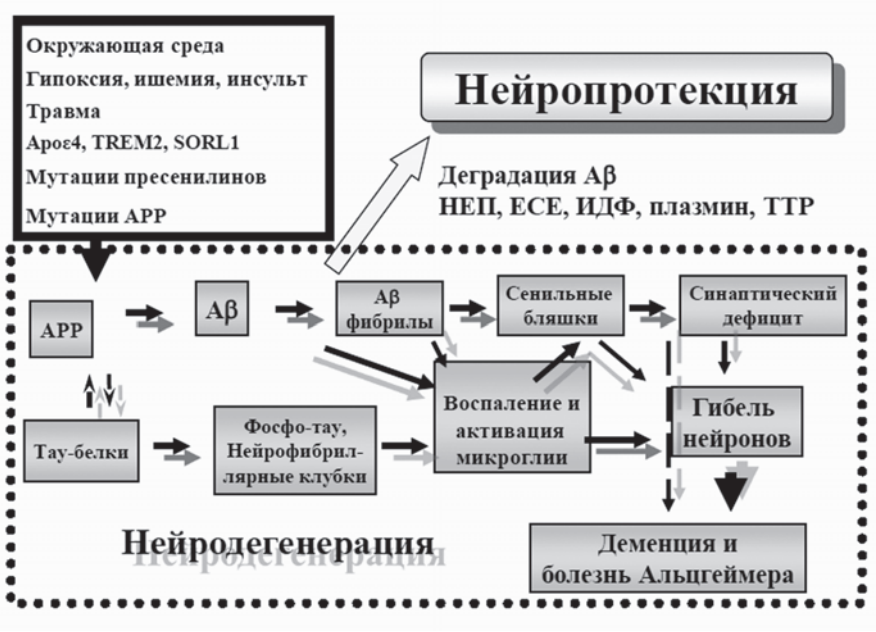


Рис. 7. Схематическое изображение каскада патологических изменений, имеющих место при нейродегенерации и БА, и факторов, влияющих на их развитие

Литература

Дубровская Н.М., Наливаева Н.Н., Плеснева С.А. и др. Изменение активности амилоид-деградирующих металлопептидаз приводит к нарушению памяти у крыс // ЖВНД. 2009. Т. 59. № 5. С. 615-623.

Журавин И.А., Дубровская Н.М., Кочкина Е.Г. и др. Исследование действия гипоксии на развитие функций мозга и метаболизм амилоидного пептида с целью разработки средств ранней диагностики и профилактики болезни Альцгеймера // Технол. жив. сист. 2007. Т. 4. № 5-6. С. 109-122.

Журавин И.А., Дубровская Н.М., Васильев Д.С. и др. Эпигенетическая и фармакологическая регуляция амилоид-деградирующего фермента неприлизина приводит к изменению когнитивных функций млекопитающих // Докл. РАН. 2011. Т. 438. № 6. С. 838-841.

Козина Л.С., Кочкина Е.Г., Наливаева Н.Н. и др. Влияние пептидов вилон и эпиталон на уровень экспрессии неприлизина и инсулин-деградирующего фермента в клетках нейробластомы человека в норме и при гипоксии // Нейрохимия. 2008. Т. 25. № 1-2. С. 82-85.

Наливаева Н.Н., Бабусикова Е., Доброта Д., Тернер Э. Влияние ишемии и реперфузии на содержание предшественника амилоидного пептида и продуктов его протеолиза в гиппокампе крыс // Нейрохимия. 2005. Т. 20. С. 1-6.

Наливаева Н.Н., Макова Н.З., Кочкина Е.Г. и др. Влияние геропротекторных пептидов на активность холинэстераз и образование растворимой формы предшественника амилоидного пептида в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y // Нейрохимия. 2011. Т. 28. № 3. С. 200-207.

Самойлов М.О. Реакция нейронов на гипоксию. Л.: Наука, 1985. 190 с.

Степаничев М.Ю., Моисеева Ю.В., Гуляева Н.В. «Инъекционные» модели болезни Альцгеймера: окислительный стресс в механизме токсичности AF64A и β-амилоидного пептида у грызунов // Нейрохимия. 2002. Т. 19. С. 165-175.

Allard S., Leon W.C., Pakavathkumar P. et al. Impact of the NGF maturation and degradation pathway on the cortical cholinergic system phenotype // J. Neurosci. 2012. Vol. 32. № 6. P. 2002-2012.

Alikhani N., Guo L., Yan S. et al. Decreased Proteolytic Activity of the Mitochondrial Amyloid-β Degrading Enzyme, PreP Peptidasome, in Alzheimer's Disease Brain Mitochondria // J. Alzheimers Dis. 2011. Vol. 27. № 1. P. 75-87.

Allinson T.M., Parkin E.T., Condon T.P. et al. The role of ADAM10 and ADAM17 in the ectodomain shedding of angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein // Eur. J. Biochem. 2004. Vol. 27. P. 539-547.

Alonso A., Zaidi T., Novak M. et al. Hyperphosphorylation induces self-assembly of tau into tangles of paired helical filaments/straight filaments // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98. P. 6923-6928.

Apelt J., Schliebs R., Beck M. et al. Expression of amyloid precursor protein mRNA isoforms in rat brain is differentially regulated during postnatal maturation and by cholinergic activity // Int. J. Dev. Neurosci. 1997. Vol. 15. P. 95-112.

Apelt J., Ach K., Schliebs R. Ageing-related down-regulation of neprilysin, a putative b-amyloid-degrading enzyme, in transgenic Tg2576 Alzheimer-like mouse brain is accompanied by an astroglial upregulation in the vicinity of b-amyloid plaques // Neurosci. Lett. 2003. Vol. 339. P. 183-186.

Arbel-Ornath M., Hudry E., Eikermann-Haerter K. et al. Interstitial fluid drainage is impaired in ischemic stroke and Alzheimer's disease mouse models // Acta Neuropathol. 2013. Vol. 126. № 3. P. 353-364.

Asai M., Yagishita S., Iwata N. et al. An alternative metabolic pathway of amyloid precursor protein C-terminal fragments via cathepsin B in a human neuroglioma model // FASEB J. 2011. Vol. 25. № 10. P. 3720-3730.

Avila J., Lucas J. J., Perez M., Hernandez F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions // Physiol. Rev. 2004. Vol. 84. P. 361-384.

Aydin D., Weyer S.W., Müller U.C. Functions of the APP gene family in the nervous system: insights from mouse models // Exp. Brain Res. 2012. Vol. 217. P. 423-434.

Backstrom J.R., Lim G.P., Cullen M.J., Tokes Z.A. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-b peptide (1-40) // J. Neurosci. 1996. Vol. 16. P. 7910-7919.

Bai B., Hales C.M., Chen P.C. et al. U1 small nuclear ribonucleoprotein complex and RNA splicing altera-

tions in Alzheimer's disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. Vol. 110. № 41. P. 16562-16567.
Baig S., Kehoe P.G., Love S. MMP-2, -3 and -9 levels and activity are not related to Aβ load in the frontal cortex in Alzheimer's disease // Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2008. Vol. 34. P. 205-215.
Ballatore C., Lee V.M., Trojanowski J.Q. Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders // Nat. Rev. Neurosci. 2007. Vol. 8. № 9. P. 663-672.
Barker R., Love S., Kehoe P.G. Plasminogen and plasmin in Alzheimer's disease // Brain Res. 2010. Vol. 1355. P. 7-15.
Barnes K., Walkden B.J., Wilkinson T.C., Turner A.J. Expression of endothelin-converting enzyme in both neuroblastoma and glial cell lines and its localization in rat hippocampus // J. Neurochem. 1997. Vol. 68. P. 570-577.
Barone E., Di Domenico F., Butterfield D.A. Statins more than cholesterol lowering agents in Alzheimer Disease: their pleiotropic functions as potential therapeutic TARGETS // Biochem. Pharmacol. 2013. pii: S0006-2952(13)00714-4. doi: 10.1016/j.bcp.2013.10.030.
Beckett C., Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Turner A.J. Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: the AICD enigma // Cell. Signal. 2012. Vol. 24. № 2. P. 402-409.
Bellingham S.A., Lahiri D. K., Maloney B. et al. Copper depletion down-regulates expression of Alzheimer's disease Amyloid-β precursor protein gene // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279. P. 20378-20386.
Belyaev N.D., Nalivaeva N.N., Makova N.Z., Turner A.J. Neprilysin gene expression requires binding of the APP-intracellular domain to its promoter and is de-repressed by histone deacetylase inhibitors: implications for Alzheimer's disease // EMBO J. 2009. Vol. 10. P. 94-100.
Belyaev N.D., Kellett K.A., Beckett C. et al. The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a βsecretase-dependent pathway // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285. № 53. P. 41443-41454.
Bennett I.J., Madden D.J. Disconnected Aging: Cerebral White Matter Integrity and Age-Related Differences in Cognition // Neuroscience. 2013. pii: S0306-4522(13)00973-1. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.11.026. [Epub ahead of print].
Bennett B.D., Babu-Khan S., Loeloff R. et al. Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 20647-20651.
Bertram L., Tanzi R.E. Thirty years of Alzheimer's disease genetics: the implications of systematic meta-analyses // Nat. Rev. Neurosci. 2008. Vol. 9. P. 768-778.
Bertram L., McQueen M.B., Mullin K. et al. Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database // Nat. Genet. 2007. Vol. 39. P. 17-23.
Bigl M., Apelt J., Eschrich K., Schliebs R. Cortical glucose metabolism is altered in aged transgenic Tg2576 mice that demonstrate Alzheimer plaque pathology // J. Neural. Transm. 2003. Vol. 110. P. 77-94.
Blomqvist M.E., Silburn P.A., Buchanan D.D. et al. Sequence variation in the proximity of IDE may impact age at onset of both Parkinson disease and Alzheimer disease // Neurogenetics. 2004. Vol. 5. P. 115-119.
Bodovitz S., Falduto M.T., Frail D.E., Klein W.L. Iron levels modulate alpha-secretase cleavage of amyloid precursor protein // J. Neurochem. 1995. Vol. 64. № 1. P. 307-315.
Borchelt D.R., Thinakaran G., Eckman C.B. et al. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Aβ1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo // Neuron. 1996. Vol. 17. P. 1005-1013.
Brouillett J., Caillierez R., Zommer N. et al. Neurotoxicity and memory deficits induced by soluble low-molecular-weight amyloid-β1-42 oligomers are revealed in vivo by using a novel animal model // J. Neurosci. 2012. Vol. 32. P. 7852-7861.
Brouwers N., Sleegers K., Van Broeckhoven C. Molecular genetics of Alzheimer's disease: an update // Ann. Med. 2008. Vol. 40. P. 562-583.
Bush A.I., Tanzi R.E. The galvanization of ß-amyloid in Alzheimer's disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99. P. 7317–7319.
Butterfield D.A., Drake J., Pocernich C., Castegna A. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid b-peptide // Trends Mol. Med. 2002. Vol. 7. P. 548-554.
Buxbaum J.N., Ye Z., Reixach N. et al. Transthyretin protects Alzheimer's mice from the behavioral and biochemical effects of Aβ toxicity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. Vol. 105. P. 2681-2686.
Caccamo A., Oddo S., Sugarman M.C. et al. Age- and region-dependent alterations in Aβ-degrading enzymes: implications for Aβ-induced disorders // Neurobiol. Aging. 2005. Vol. 26. P. 645-654.
Cai J., Qi X., Kociok N. et al. β-Secretase (BACE1) inhibition causes retinal pathology by vascular dysregu-

lation and accumulation of age pigment // EMBO Mol. Med. 2012. Vol. 4. № 9. P. 980-991.
Caille I., Allinquant B., Dupont E. et al. Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone // Development. 2004. Vol. 131. P. 2173-2181.
Cairns N.J., Bigio E.H., Mackenzie I.R. et al. Neuropathologic diagnostic and nosologic criteria for frontotemporal lobar degeneration: consensus of the Consortium for Frontotemporal Lobar Degeneration // Acta Neuropathol. 2007. Vol. 114. № 1. P. 5-22.
Canet-Aviles R.M., Anderton M., Hooper N.M. et al. Muscarine enhances soluble amyloid precursor protein secretion in human neuroblastoma SH-SY5Y by a pathway dependent on protein kinase C(a), src-tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase but not phospholipase C // Brain Res. Mol. 2002. Vol. 102. P. 62-72.
Carty N., Nash K.R., Brownlow M. et al. Intracranial injection of AAV expressing NEP but not IDE reduces amyloid pathology in APP+PS1 transgenic mice // PLoS One. 2013. Vol. 8. № 3. P. e59626.
Caspersen C., Wang N., Yao J. et al. Mitochondrial Aβ: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease // FASEB J. 2005. Vol. 19. P. 2040-2041.
Chasseigneaux S., Allinquant B. Functions of Aβ, sAPPα and sAPPβ : similarities and differences // J. Neurochem. 2012. Vol. 120. Suppl. 1. P. 99-108.
Chen Z., Zhong C. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies // Prog. Neurobiol. 2013. Vol. 108. P. 21-43.
Chua L.M., Lim M.L., Wong B.S. The Kunitz-protease inhibitor domain in amyloid precursor protein reduces cellular mitochondrial enzymes expression and function // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2013. Vol. 437. № 4. P. 642-647.
Citron B.A., Dennis J.S., Zeitlin R.S., Echeverria V. Transcription factor Sp1 dysregulation in Alzheimer's disease // J. Neurosci. Res. 2008. Vol. 86. P. 2499-2504.
Corder E.H., Saunders A.M., Risch N.J. et al. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease // Nat. Genet. 1994. Vol. 7. P. 180-184.
Cordy J.M., Hussain I., Dingwall C. et al. Exclusively targeting b-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates β-site processing of the amyloid precursor protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. Vol. 100. P. 11735-11740.
Costa R., Ferreira-da-Silva F., Saraiva M.J., Cardoso I. Transthyretin protects against A-β peptide toxicity by proteolytic cleavage of the peptide: a mechanism sensitive to the Kunitz protease inhibitor // PLoS One. 2008. Vol. 3. № 8. P. e2899.
Coulson E.J., Paliga K., Beyreuther K., Masters C.L. What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function // Neurochem. Int. 2000. Vol. 36. 175-184.
Crawford F.C., Freeman M.J., Schinka J.A. et al. A polymorphism in the cystatin C gene is a novel risk factor for late-onset Alzheimer's disease // Neurology. 2000. Vol. 55. P. 763-768.
Cummings J.L., Back C. The cholinergic hypothesis of neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease // Am. J. Geriatr. Psychiatry. 1998. Vol. 6. Suppl. 1. P. 64-78.
De Strooper B. Aph-1, Pen-2 and Nicastrin with Presenilin generate an active g-Secretase complex // Neuron. 2003. Vol. 38. P. 9-12.
Deng Y., Wang Z., Wang R. et al. Amyloid-β protein (Aβ) Glu11 is the major β-secretase site of β-site amyloid-β precursor protein-cleaving enzyme 1(BACE1), and shifting the cleavage site to Aβ Asp1 contributes to Alzheimer pathogenesis // Eur. J. Neurosci. 2013. Vol. 37. № 12. P. 1962-1969.
Deuss M., Reiss K., Hartmann D. Part-time α-secretases: the functional biology of ADAM 9, 10 and 17 // Curr. Alzheimer Res. 2008. Vol. 5. P. 187-201.
Di Legge S., Hachinski V. Prospects for prevention and treatment of vascular cognitive impairment // Curr. Opin. Invest. Drugs. 2003. Vol. 4. P. 1082-1087.
Dore S., Kar S., Rowe W., Quirion R. Distribution and levels of [^{125}I]IGF-I, [^{125}I]IGF-II and [^{125}I]insulin receptor binding sites in the hippocampus of aged memory-unimpaired and -impaired rats // Neuroscience. 1997. Vol. 80. P. 1033-1040.
Du J., Cho P.Y., Yang D.T., Murphy R.M. Identification of β-amyloid-binding sites on transthyretin // Protein Eng. Des. Sel. 2012. Vol. 25. P. 337-345.
Dubrovskaya N.M., Nalivaeva N.N., Vasilev D.S. et al. Mechanisms of short-term working memory deficit // Short-Term Memory: New Research. Eds. Garifallia Kalivas, Sappho F. Petralia. NY: Nova Science Publishers, Inc., 2012. Ch. 6. P. 155-173.

Duckworth W.C., Bennett R.G., Hamel F.G. Insulin degradation: progress and potential // Endocr. Rev. 1998. Vol. 19. P. 608-624.

Eckman E.A., Watson M., Marlow L. et al. Alzheimer's disease b-amyloid peptide is increased in mice deficient in endothelin-converting enzyme // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. P. 2081-2084.

Edbauer D., Willem M., Lammich S. et al. Insulin-degrading enzyme rapidly removes the β-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. P. 13389-13393.

Eggert S., Paliga K., Soba P. et al. The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279. № 18. P. 18146-18156..

Ehehalt R., Keller P., Haass C. et al. Amyloidogenic processing of the Alzheimer b-amyloid precursor protein depends on lipid rafts // J. Cell Biol. 2003. Vol. 160. P. 113-123.

El-Agnaf O.M., Mahil D.S., Patel B.P., Austen B.M. Oligomerization and toxicity of b-amyloid-42 implicated in Alzheimer's disease // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. Vol. 273. P. 1003-1007.

ElAli A., Rivest S. The role of ABCB1 and ABCA1 in β-amyloid clearance at the neurovascular unit in Alzheimer's disease // Front. Physiol. 2013. Vol. 4. P. 45.

Emoto N., Yanagisawa M. Endothelin-converting enzyme-2 is a membrane-bound, phosphoramidon-sensitive mettaloprotease with acidic pH optimum // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 15262-15268.

Erdos E.G., Skidgel R.A. Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) and related regulators of peptide hormones // FASEB J. 1989. Vol. 3. P. 145-151.

Ertekin-Taner N., Ronald J., Feuk L. et al. Elevated amyloid-β protein (Aβ42) and late onset Alzheimer's disease are associated with single nucleotide polymorphisms in the urokinase-type plasminogen activator gene // Hum. Mol. Genet. 2005. Vol. 14. P. 447-460.

Fabbro S., Seeds N.W. Plasminogen activator activity is inhibited while neuroserpin is up-regulated in the Alzheimer disease brain // J. Neurochem. 2009. Vol. 109. № 2. P. 303-315.

Fabbro S., Schaller K., Seeds N.W. Amyloid-beta levels are significantly reduced and spatial memory defects are rescued in a novel neuroserpin-deficient Alzheimer's disease transgenic mouse model // J. Neurochem. 2011. Vol. 118. № 5. P. 928-938.

Facchinetti P., Rose C., Schwartz J.C., Ouimet T. Ontogeny, regional and cellular distribution of the novel metalloprotease neprilysin 2 in the rat: a comparison with neprilysin and endothelin-converting enzyme-1 // Neuroscience. Vol. 118. P. 627-639.

Fahrenholz F. α-Secretase as a therapeutic target // Curr. Alzheimer Res. 2007. Vol. 4. P. 412-417.

Falkevall A., Alikhani N., Bhushan S. et al. Degradation of the amyloid β-protein by the novel mitochondrial peptidasome, PreP // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281. P. 29096-29104.

Farris W., Mansourian S., Leissring M.A. et al. Partial loss-of-function mutations in insulin-degrading enzyme that induce diabetes also impair degradation of amyloid b-protein // Am. J. Pathol. 2004. Vol. 164. P. 1425-1434.

Farzan M., Schnitzler C. E., Vasilieva N. et al. BACE2, a β-secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-β precursor protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 9712-9717.

Ferretti M.T., Partridge V., Leon W.C. et al. Transgenic mice as a model of pre-clinical Alzheimer's disease // Curr. Alzheimer Res. 2011. Vol. 8. P. 4-23.

Fisk L., Nalivaeva N.N., Turner A.J. Regulation of endothelin-converting enzyme-1 expression in human neuroblastoma cells // Exp. Biol. Med. 2006. Vol. 231. P. 1048-1053.

Fisk L., Nalivaeva N.N., Boyle J.P. et al. Effects of hypoxia and oxidative stress on expression of neprilysin in human neuroblastoma cells and rat cortical neurones and astrocytes // Neurochem. Res. 2007. Vol. 32. P. 1741-1748.

Fodero L.R., Mok S.S., Losic D. et al. α7-nicotinic acetylcholine receptors mediate an Aβ(1-42)-induced increase in the level of acetylcholinesterase in primary cortical neurones // J. Neurochem. 2004. Vol. 88. P. 1186-1193.

Fraser P.E., Nguyen J.T., Inouye H.et al. Fibril formation by primate, rodent, and Dutch-hemorrhagic analogues of Alzheimer amyloid β-protein // Biochemistry. 1992. Vol. 31. P. 10716-10723.

Gasparini L., Xu H. Potential roles of insulin and IGF-1 in Alzheimer's disease // Trends Neurosci. 2003. Vol. 26. P. 404-406.

Ge Y.-W., Lahiri D. K. Regulation of promoter activity of the APP gene by cytokines and growth factors: implications in Alzheimer's disease // Ann. NY Acad. Sci. 2002. Vol. 973. P. 463-467.

Ghaddar G., Ruchon A.F., Carpentier M. et al. Molecular cloning and biochemical characterization of a new mouse testis soluble-zinc-metallopeptidase of the neprilysin family // Biochem. J. 2000. Vol. 347. № 2. P. 419-429.

Ghiso J., Shayo M., Calero M. et al. Systemic catabolism of Alzheimer's Aβ40 and Aβ42 // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279. P. 45897-45908.

Goate A., Hardy J. Twenty years of Alzheimer's disease-causing mutations // J. Neurochem. 2012. Vol. 120. Suppl. 1. P. 3-8.

Golomb J., de Leon M.J., Kluger A. et al. Hippocampal atrophy in normal aging. An association with recent memory impairment // Arch. Neurol. 1993. Vol. 50. P. 967-973.

Gregory G.C., Halliday G.M. What is the dominant Aβ species in human brain tissue? A review // Neurotox. Res. 2005. Vol. 7. P. 29-41.

Griffiths H.H., Whitehouse I.J., Baybutt H. et al. Prion protein interacts with BACE1 protein and differentially regulates its activity toward wild type and Swedish mutant amyloid precursor protein // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286. № 38. P. 33489-33500.

Gu J., Zheng, J.Q. Microtubules in dendritic spine development and plasticity // Open Neurosci. J. 2009. Vol. 3. P. 128–133.

Gunyuzlu P.L., White W.H., Davis G.L. et al. A yeast genetic assay for caspase cleavage of the amyloid-β precursor protein // Mol. Biotechnol. 2000. Vol. 15. P. 29-37.

Haass C., Selkoe D.J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β-peptide // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2007. Vol. 8. P. 101-112.

Haass C., Schlossmacher M.G., Hung A.Y. et al. Amyloid β-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism // Nature. 1992. Vol. 359. P. 322-325.

Han X., Rozen S., Boyle S.H. et al. Metabolomics in early Alzheimer's disease: identification of altered plasma sphingolipidome using shotgun lipidomics // PLoS One. 2011. Vol. 6. P. e21643.

Hardy J.A., Higgins G.A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis // Science. 1992. Vol. 256. P. 184-185.

Hardy J., Selkoe D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. An updated summary of the amyloid hypothesis // Science. 2002. Vol. 297. P. 353-356.

Hawkes C.A., Gatherer M., Sharp M.M. et al. Regional differences in the morphological and functional effects of aging on cerebral basement membranes and perivascular drainage of amyloid-β from the mouse brain // Aging Cell. 2013. Vol. 12. № 2. P. 224-236.

He N., Jin W.L., Lok K.H. et al. Amyloid-β1-42 oligomer accelerates enescence in adult hippocampal neural stem/progenitor cells via formylpeptide receptor 2 // Cell Death. Dis. 2013. Vol. 4. P. e924. doi: 10.1038/cddis.2013.437.

Heber S., Herms J., Gajic V. et al. Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members // J. Neurosci. 2000. Vol. 20. P. 7951-7963.

Hébert S.S., Horré K., Nicolaï L. et al. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/β-secretase expression // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. Vol. 105. № 17. P. 6415-6420.

Helbecque N., Cottel D., Hermant X., Amouyel P. Impact of the matrix metalloproteinase MMP-3 on dementia // Neurobiol. Aging. 2007. Vol. 28. P. 1215-1220.

Heldin C.H., Ericsson J. Signal transduction. RIPping tyrosine kinase receptors apart // Science. 2001. Vol. 294. P. 2111-2113.

Hemming M.L., Selkoe D.J. Amyloid β-protein is degraded by cellular angiotensin-converting enzyme (ACE) and elevated by an ACE inhibitor // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280. P. 37644-37650.

Hemming M.L., Selkoe D.J., Farris, W. Effects of prolonged angiotensin-converting enzyme inhibitor treatment on amyloid β-protein metabolism in mouse models of Alzheimer disease // Neurobiol. Dis. 2007. Vol. 26. P. 273-281.

Hicks D.A., Nalivaeva N.N., Turner A.J. Lipid rafts and Alzheimer's disease: protein-lipid interactions and perturbation of signalling // Front. Physiol. 2012. Vol. 3. P. 189. doi: 10.3389/fphys.2012.00189.

Hitomi J., Katayama T., Eguchi Y. et al. Involvement of caspase-4 in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and Aβ-induced cell death // J. Cell Biol. 2004. Vol. 165. P. 347-356.

Holsinger R.M., Goense N., Bohorquez J., Strappe P. Splice variants of the Alzheimer's disease β-secretase, BACE1 // Neurogenetics. 2013. Vol. 14. № 1. P. 1-9.
Holtzman DM, Mandelkow E, Selkoe DJ. Alzheimer disease in 2020 // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2012. Vol. 2. № 11. P. a011585.
Hong L., Koelsch G., Lin X. et al. Structure of the protease domain of memapsin 2 (β-secretase) complexed with inhibitor // Science. 2000. Vol. 290. P. 150-153.
Hook V., Hook G., Kindy M. Pharmacogenetic features of cathepsin B inhibitors that improve memory deficit and reduce β-amyloid related to Alzheimer's disease // Biol. Chem. 2010. Vol. 391. P. 861-872.
Hooper N.M., Turner A.J. A new take on prions: preventing Alzheimer's disease // Trends Biochem. Sci. 2008. Vol. 33. P.151-155.
Hooper N.M., Turner A.J. The search for α-secretase and its potential as a therapeutic approach to Alzheimer s disease // Curr. Med. Chem. 2002. Vol. 9. P. 1107-1119.
Hoos M.D., Ahmed M., Smith S.O., Van Nostrand W.E. Myelin basic protein binds to and inhibits the fibrillar assembly of Aβ42 in vitro // Biochemistry. 2009. Vol. 48. P. 4720-4727.
Hoyer S. Glucose metabolism and insulin receptor signal transduction in Alzheimer disease // Eur. J. Pharmacol. 2004. Vol. 490. P. 115-125.
Hu J., Igarashi A., Kamata M., Nakagawa H. Angiotensin-converting enzyme degrades Alzheimer amyloid β-peptide (Aβ); retards Aβ aggregation, deposition, fibril formation; and inhibits cytotoxicity // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 47863-47868.
Huang J.Y., Bruno A.M., Patel C.A. et al. Human membrane metallo-endopeptidase-like protein degrades both β-amyloid 42 and β-amyloid 40 // Neuroscience. 2008. Vol. 155. № 1. P. 258-262.
Huang J.Y., Hafez D.M., James B.D. et al. Altered NEP2 expression and activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease // J. Alzheimers Dis. 2012. Vol. 28. № 2. P. 433-41.
Ittner L.M., Götz J. Amyloid-β and tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease // Nat. Rev. Neurosci. 2011. Vol. 12. № 2. P. 65-72.
Iwata N., Takaki Y., Fukami S. et al. Region-specific reduction of A b-degrading endopeptidase, neprilysin, in mouse hippocampus upon aging // J. Neurosci. Res. 2002. Vol. 70. P. 493-500.
Iwata N., Mizukami H., Shirotani K. et al. Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-β peptide in mouse brain // J. Neurosci. 2004. Vol. 24. P. 991-998.
Jacobsen K.T., Iverfeldt K. Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors// Cell. Mol. Life Sci. Vol. 66. P. 2299-2318.
Johnstone E. M., Chaney M. O., Norris F. H. et al. Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis // Brain Res. Mol. Brain Res. 1991. Vol. 10. P. 299-305.
Jonsson T., Atwal J.K., Steinberg S. et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline // Nature. 2012. Vol. 488. № 7409. P. 96-99.
Jung C. K., Herms J. Role of APP for dendritic spine formation and stability // Exp. Brain Res. 2012. Vol. 217. P. 463-470.
Jurisch-Yaksi N., Sannerud R., Annaert W. A fast growing spectrum of biological functions of γ-secretase in development and disease // Biochim. Biophys. Acta. 2013. Vol. 1828. № 12. P. 2815-2827.
Kaeser S.A., Herzig M.C., Coomaraswamy J. et al. Cystatin C modulates cerebral β-amyloidosis // Nat. Genet. 2007. Vol. 39. P. 1437-1439.
Kametani F. ε-secretase: reduction of amyloid precursor protein epsilon-site cleavage in Alzheimer's disease // Curr. Alzheimer Res. 2008. Vol. 5. P. 165-171.
Kandalepas P.C., Vassar R. Identification and biology of β-secretase // J. Neurochem. 2012. Vol. 120. Suppl. 1. P. 55-61.
Kanemitsu H., Tomiyama T., Mori H. Human neprilysin is capable of degrading amyloid b peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form // Neurosci. Lett. 2003. Vol. 350. P. 113-116.
Katzov H., Bennet A.M., Kehoe P. et al. A cladistic model of ACE sequence variation with implications for myocardial infarction, Alzheimer disease and obesity // Hum. Mol. Genet. 2004. Vol. 13. P. 2647-2657.
Kauwe B., Van den Steen P.E., Opdenakker G. The biochemical, biological, and pathological kaleidoscope of cell surface substrates processed by matrix metalloproteinases // Crit. Rev. Biochem. 2007. Mol. Biol. Vol. 42. P. 113-185.

Kehoe P.G., Wilcock G.K. Is inhibition of the renin-angiotensin system a new treatment option for Alzheimer's disease? // Lancet Neurol. 2007. Vol. 6. P. 373-378.
Kehoe P.G., Katzov H., Feuk L. et al. Haplotypes extending across ACE are associated with Alzheimer's disease // Hum. Mol. Gen. 2003. Vol. 12. P. 859-867.
Kern A., Roempp B., Prager K. et al. Down-regulation of endogenous amyloid precursor protein processing due to cellular aging // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 281. P. 2405-2413.
Kerridge C., Belyaev N.D., Nalivaeva N.N. Turner A.J. The Aβ-clearance protein transthyretin (TTR), like neprilysin, is epigenetically regulated by the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) // J. Neurochem. 2014. Vol. 130. № 3. P. 419-431.
Kiko T., Nakagawa K., Tsuduki T. et al. MicroRNAs in plasma and cerebrospinal fluid as potential markers for Alzheimer's disease // J. Alzheimers Dis. 2013. Vol. 39. № 2. P. 253-259.
Kim M.J., Chae S.S., Koh Y.H. et al. Glutamate carboxypeptidase II: an amyloid peptide-degrading enzyme with physiological function in the brain // FASEB J. 2010. Vol. 24. P. 4491-4502.
Kimberly W.T., Xia W., Rahmati T. The transmembrane aspartates in presenilin 1 and 2 are obligatory for γ-secretase activity and amyloid β-protein generation // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 3173-3178.
Kingston I. B., Castro M.J.M., Anderson S.A. In vitro stimulation of tissue-type plasminogen activator by Alzheimer amyloid b-peptide analogues // Nature Med. 1995. Vol. 1. P. 138-142.
Kohli B.M., Pflieger D., Mueller L.N. et al. Interactome of the amyloid precursor protein APP in brain reveals a protein network involved in synaptic vesicle turnover and a close association with Synaptotagmin-1 // J. Proteome Res. 2012. Vol. 11. P. 4075-4090.
Koike H., Tomioka S., Sorimachi H. et al. Membrane-anchored metalloprotease MDC9 has an α-secretase activity responsible for processing the amyloid precursor protein // Biochem. J. 1999. Vol. 343. P. 371-375.
Kopan R., Ilagan M. X. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism // Cell. 2009. Vol. 137. P. 216-233.
Koudinov A.R., Berezov T.T. Alzheimer's amyloid-β (Aβ) is an essential synaptic protein, not neurotoxic junk // Acta Neurobiol. Exp. (Wars). 2004. Vol. 64. P. 71-79.
Kowalska A. Amyloid precursor protein gene mutations responsible for early-onset autosomal dominant Alzheimer's disease // Folia Neuropathol. 2003. Vol. 41. P. 35-40.
Kracun I., Rosner H., Drnovsek V. et al. Human brain gangliosides in development, aging and disease // Int. J. Dev. Biol. 1991. Vol. 35. P. 289-295.
Kroner Z. The relationship between Alzheimer's disease and diabetes: Type 3 diabetes? // Altern. Med. Rev. 2009. Vol. 14. № 4. P. 373-379.
Kurochkin I.V., Goto S. Alzheimer's b-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme // FEBS Lett. 1994. Vol. 345. P. 33-37.
Lagouge M., Larsson N.G. The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing // J. Intern. Med. 2013. Vol. 273. № 6. P. 529-543.
Lahiri D.K., Nall C. Promoter activity of the gene encoding the β-amyloid precursor protein is up-regulated by growth factors, phorbol ester, retinoic acid and interleukin-1 // Brain Res. Mol. Brain Res. 1995. Vol. 32. P. 233-240.
Lahiri D.K., Zawia N.H., Greig N.H. et al. Early-life events may trigger biochemical pathways for Alzheimer's disease: the «LEARn» model // Biogerontology. 2008. Vol. 9. P. 375-379.
Lathia J.D., Mattson M.P., Cheng A. Notch: from neural development to neurological disorders // J. Neurochem. 2008. Vol. 107. P. 1471-1481.
Lau P., Bossers K., Janky R. et al. Alteration of the microRNA network during the progression of Alzheimer's disease // EMBO Mol. Med. 2013. Vol. 5. № 10. P. 1613-1634.
Lauderback C.M., Hackett J.M., Huang F.F. et al. The glial glutamate transporter, GLT-1, is oxidatively modified by 4-hydroxy-2-nonenal in the Alzheimer's disease brain: the role of Aβ1-42 // J. Neurochem. 2001. Vol. 78. P. 413-416.
Laurén J., Gimbel D.A., Nygaard H.B. et al. Cellular prion protein mediates impairment of synaptic plasticity by amyloid-beta oligomers // Nature. 2009. Vol. 457. P. 1128-1132.
Leal M.C., Dorfman V.B., Gamba A.F. et al. Plaque-associated overexpression of insulin-degrading enzyme in the cerebral cortex of aged transgenic tg2576 mice with Alzheimer pathology // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2006. Vol. 65. P. 976-987.

Ledesma M.D., Da Silva J.S., Crassaerts K. et al. Brain plasmin enhances APP a-cleavage and Ab degradation and is reduced in Alzheimer's disease brains // EMBO Rep. 2000. Vol. 1. P. 530-535.

Ledesma M.D., Da Silva J.S., Schevchenko A. et al. Proteomic characterisation of neuronal sphingolipid-cholesterol microdomains: role in plasminogen activation // Brain Res. 2003. Vol. 987. P. 107-116.

Lefranc-Jullien S., Sunyach C., Checler F. APPε, the ε-secretase-derived N-terminal product of the β-amyloid precursor protein, behaves as a type I protein and undergoes α-, β- and γ-secretase cleavages // J. Neurochem. 2006. Vol. 97. P. 807-817.

Lehmann .D.J., Cortina-Borja M., Warden D.R. et al. Large meta-analysis establishes the ACE insertion-deletion polymorphism as a marker of Alzheimer's disease // Am. J. Epidemiol. 2005. Vol. 162. P. 305-317.

Leissring M.A., Farris W., Chang A.Y. et al. Enhanced proteolysis of b-amyloid in APP transgenic mice prevents plaque formation, secondary pathology, and premature death // Neuron. 2003. Vol. 40. P. 1087-1093.

Leissring M.A., Farris W., Wu X. et al. Alternative translation initiation generates a novel isoform of insulin-degrading enzyme targeted to mitochondria // Biochem. J. 2004. Vol. 383. P. 439-446.

Lewis J., Dickson D.W., Lin W.L. et al. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP // Science. 2001. Vol. 293. № 5534. P. 1487-1491.

Li H., Wang B., Wang Z. et al. Soluble amyloid precursor protein (APP) regulates transthyretin and Klotho gene expression without rescuing the essential function of APP // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. Vol. 107. № 40. P. 17362-17367.

Liao M.C., Ahmed M., Smith S.O., Van Nostrand W.E. Degradation of amyloid β protein by purified myelin basic protein // J. Biol. Chem. 2009. Vol. 284. P. 28917-28925.

Lichtenthaler S.F., Wang R., Grimm H. et al. Mechanism of the cleavage specificity of Alzheimer's disease g-secretase identified by phenylalanine-scanning mutagenesis of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 3053-3058.

Lichtenthaler S.F., Haass C. Amyloid at the cutting edge: activation of a-secretase prevents amyloidogenesis in an Alzheimer disease mouse model // J. Clin. Invest. 2004. Vol. 113. P. 1384-1387.

Lilius L., Forsell C., Axelman K. et al. No association between polymorphisms in the neprilysin promoter region and Swedish Alzheimer's disease patients // Neurosci. Lett. 2003. Vol. 337. P. 111-113.

Liu R., McAllister C., Lyubchenko Y., Sierks M.R. Proteolytic antibody light chains alter b-amyloid aggregation and prevent cytotoxicity // Biochemistry. 2004. Vol. 43. P. 9999-10007.

Liu Y., Yoo M.J., Savonenko A. et al. Amyloid pathology is associated with progressive monoaminergic neurodegeneration in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease // J. Neurosci. 2008. Vol. 28. P. 13805-13814.

Liu R.M., van Groen T., Katre A. et al. Knockout of plasminogen activator inhibitor 1 gene reduces amyloid beta peptide burden in a mouse model of Alzheimer's disease // Neurobiol. Aging. 2011. Vol. 32. P. 1079-1089.

Long J.M., Lahiri D.K. MicroRNA-101 downregulates Alzheimer's amyloid-β precursor protein levels in human cell cultures and is differentially expressed // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. Vol. 404. P. 889-895.

Long J.M., Ray B., Lahiri D.K. MicroRNA-153 physiologically inhibits expression of amyloid-β precursor protein in cultured human fetal brain cells and is dysregulated in a subset of Alzheimer disease patients // J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287. P. 31298-31310.

Luo Y., Bolon B., Kahn S. et al. Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's β-secretase, have normal phenotype and abolished β-amyloid generation // Nat. Neurosci. 2001. Vol. 4. P. 231-232.

Ma Q.H., Futagawa T., Yang W.L. et al. A TAG1-APP signalling pathway through Fe65 negatively modulates neurogenesis // Nat. Cell Biol. 2008. Vol. 10. P. 283-294.

Mahley R.W., Huang Y., Weisgraber K.H. Detrimental effects of apolipoprotein E4: potential therapeutic targets in Alzheimer's disease // Curr. Alzheimer Res. 2007. Vol. 4. P. 537-540.

Maloney B., Ge Y.W., Greig N., Lahiri D.K. Presence of a «CAGA box» in the APP gene unique to amyloid plaque-forming species and absent in all APLP-1/2 genes: implications in Alzheimer's disease // FASEB J. 2004. Vol. 18. P. 1288-1290.

Marr R.A., Rockenstein E., Mukherjee A. et al. Neprilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice // J. Neurosci. 2003. Vol. 23. P. 1992-1996.

Marr R.A., Spencer B.J. NEP-like endopeptidases and Alzheimer's disease // Curr. Alzheimer Res. 2010. Vol. 7. № 3. P. 223-229.
Martin B., de Maturana R.L., Brenneman R. et al. Class II G protein-coupled receptors and their ligands in neuronal function and protection // Neuromolecular. Med. 2005. Vol. 7. P. 3-36.
Martorana A., Sancesario G.M., Esposito Z. et al. Plasmin system of Alzheimer's disease patients: CSF analysis // J. Neural. Transm. 2012. Vol. 119. № 7. P. 763-769.
Mattson M.P. Cellular action of b-amyloid precoursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives // Physiol. Rev. 1999. Vol. 77. P. 1081-1132.
Mattson M. Pathways towards and away from Alzheimer's disease // Nature. 2004. Vol. 430. P. 631-639.
Mattson M.P., Guo Q., Furukawa K., Pedersen W.A. Presenilins, the endoplasmic reticulum, and neuronal apoptosis in Alzheimer's disease // J. Neurochem. 1998. Vol. 70. P. 1-14.
Mattson M.P., Keller J.N., Begley J.G. Evidence for synaptic apoptosis // Exp. Neurol. 1998. Vol. 153. P. 35-48.
Mattson M.P., Duan W., Pedersen W.A., Culmsee C. Neurodegenerative disorders and ischemic brain diseases // Apoptosis. 2001. Vol. 6. P. 69-81.
McGowan E., Pickford F., Kim J. et al. Aβ42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice // Neuron. 2005. Vol. 47. P. 191-199.
McKee A.C., Kowall N.W., Schumacher J.S., Beal M.F. The neurotoxicity of amyloid β protein in aged primates // Amyloid. 1998. Vol. 5. P. 1-9.
Medeiros R., Baglietto-Vargas D., LaFerla F.M. The role of tau in Alzheimer's disease and related disorders // CNS Neurosci. Ther. 2011. Vol. 17. № 5. P. 514-524.
Mehta P.D., Pirttila T., Patrick B.A. et al. Amyloid b protein 1-40 and 1-42 levels in matched cerebrospinal fluid and plasma from patients with Alzheimer's disease // Neurosci. Letters. 2001. Vol. 304. P. 102-106.
Melzig M.F., Janka M. Enhancement of neutral endopeptidase activity in SK-N-SH cells by green tea extract // Phytomedicine. 2003. Vol. 10. P. 494-498.
Merlo S., Sortino M.A. Estrogen activates matrix metalloproteinases-2 and -9 to increase β amyloid degradation // Mol. Cell. Neurosci. 2012. Vol. 49. № 4. P. 423-429.
Mi W., Pawlik M., Sastre M. et al. Cystatin C inhibits amyloid-β deposition in Alzheimer's disease mouse models // Nat. Genet. 2007. Vol. 39. P. 1440-1442.
Miners J.S., Ashby E., Van Helmond Z. et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) levels and activity in Alzheimer's disease, and relationship of perivascular ACE-1 to cerebral amyloid angiopathy // Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2008. Vol. 34. P. 181-193.
Miyashita A., Koike A., Jun G. et al. SORL1 is genetically associated with late-onset Alzheimer's disease in Japanese, Koreans and Caucasians // PLoS One. 2013. Vol. 8. № 4. P. e58618.
Mohajeri M.H., Wollmer M.A., Nitsch RM. $A\beta_{42}$-induced increase in neprilysin is associated with prevention of amyloid plaque formation in vivo // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. P. 35460-35465.
Moir R.D., Lynch T., Bush A.I. et al. Relative increase in Alzheimer's disease of soluble forms of cerebral Aβ amyloid protein precursor containing the Kunitz protease inhibitory domain // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 5013-5019.
Montine T.J., Neely M.D., Quinn J.F. et al. Lipid peroxidation in aging brain and Alzheimer's disease // Free Radic. Biol. Med. 2002. Vol. 33. P. 620-626.
Morelli L., Llovera R.E., Alonso L.G. et al. Insulin-degrading enzyme degrades amyloid peptides associated with British and Danish familial dementia // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. Vol. 332. P. 808-816.
Mori H., Takio K., Ogawara M., Selkoe D.J. Mass spectrometry of purified amyloid β protein in Alzheimer's disease // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267. P. 17082-17086.
Mrak R.E., Griffin W.S. Glia and their cytokines in progression of neurodegeneration // Neurobiol. Aging. 2005. Vol. 26. P. 349-354.
Mu Y., Gage F.H. Adult hippocampal neurogenesis and its role in Alzheimer's disease // Mol. Neurodegen. 2011. Vol. 6. P. 85. doi: 10.1186/1750-1326-6-85.
Müller T., Meyer H.E., Egensperger R., Marcus K. The amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) as modulator of gene expression, apoptosis, and cytoskeletal dynamics-Relevance for Alzheimer's disease // Prog. Neurobiol. 2008. Vol. 85. P. 393-406.

Mueller-Steiner S., Zhou Y., Arai H. et al. Antiamyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B: implications for Alzheimer's disease // Neuron. 2006. Vol. 51. P. 703-714.

Nakagami Y., Abe K., Nishiyama N., Matsuki N. Laminin degradation by plasmin regulates long-term potentiation // J. Neurosci. 2000. Vol. 20. P.2003-2010.

Nalivaeva N.N., Turner A.J. The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease // FEBS Lett. 2013. Vol. 587. № 13. P. 2046-2054.

Nalivaeva N.N., Fisk L., Canet Aviles R.M. et al. Effect of prenatal hypoxia on expression of amyloid precursor protein and metallopeptidases in the rat brain // Lett. Peptide Sci. 2003. Vol. 10. P. 455-462.

Nalivaeva N.N., Fisk L., Kochkina E.G. et al. Effect of hypoxia/ischemia and hypoxic preconditioning/reperfusion on expression of some amyloid-degrading enzymes // Ann. NY. Acad. Sci. 2004. Vol. 1035. P. 21-33.

Nalivaeva N.N., Fisk L.R., Belyaev N.D., Turner A.J. Amyloid-degrading enzymes as therapeutic targets in Alzheimer's disease // Curr. Alzheimer Res. 2008. Vol. 5. P.212-224.

Nalivaeva N.N., Beckett C., Belyaev N.D., Turner A.J. Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in Alzheimer's disease? // J. Neurochem. 2012a. Vol. 120. Suppl. 1. P. 167-185.

Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Lewis D.I. et al. Effect of sodium valproate administration on brain neprilysin expression and memory in rats // J. Mol. Neurosci. 2012b. Vol. 46. № 3. P. 569-377.

Nalivaeva N.N., Belyaev N.D., Zhuravin I.A., Turner A.J. The Alzheimer's amyloid-degrading peptidase, neprilysin: can we control it? // Int. J. Alzheimers Dis. 2012c. Vol. 2012. P. ID 383796.

Namba Y., Tomonaga M., Kawasaki H. et al. Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease // Brain Res. 1991. Vol. 541. P. 163-166.

Nawrot B. Targeting BACE with small inhibitory nucleic acids – a future for Alzheimer's disease therapy? // Acta Biochim. Pol. 2004. Vol. 51. P. 431-444.

Neale J.H., Olszewski R.T., Zuo D. et al. Advances in understanding the peptide neurotransmitter NAAG and appearance of a new member of the NAAG neuropeptide family // J. Neurochem. 2011. Vol. 118. P. 490-498.

Ni R., Marutle A., Nordberg A. Modulation of α7 nicotinic acetylcholine receptor and fibrillar amyloid-β interactions in Alzheimer's disease brain // J. Alzheimers Dis. 2013. Vol. 33. № 3. P. 841-851.

Nicolls M.R. The clinical and biological relationship between Type II diabetes mellitus and Alzheimer's disease // Curr. Alzheimer Res. 2004. Vol. 1. P. 47-54.

Nizzari M., Thellung S., Corsaro A. et al. Neurodegeneration in Alzheimer disease: role of amyloid precursor protein and presenilin 1 intracellular signalling // J. Toxicol. 2012. Vol. 2012. P. 187297. doi: 10.1155/2012/187297.

Octave J.N., Pierrot N., Ferao Santos S. et al. From synaptic spines to nuclear signaling: nuclear and synaptic actions of the amyloid precursor protein // J. Neurochem. 2013. Vol. 126. № 2. P. 183-190.

Ohrui T., Matsui T., Yamaya M. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and incidence of Alzheimer's disease in Japan // J. Am. Geriatr. Soc. 2004. Vol. 52. P. 649-650.

Okamoto T., Takeda S., Murayama Y. et al. Ligand-dependent G protein coupling function of amyloid transmembrane precursor // J. Biol. Chem. 1995. Vol. 270. P. 4205-4208.

Okochi M., Tagami S., Yanagida K. et al. γ-secretase modulators and presenilin 1 mutants act differently on presenilin/γ-secretase function to cleave Aβ42 and Aβ43 // Cell. Rep. 2013. Vol. 3. № 1. P. 42-51.

Pacheco-Quinto J., Eckman E.A. Endothelin-converting enzymes degrade intracellular β-amyloid produced within the endosomal/lysosomal pathway and autophagosomes // J. Biol. Chem. 2013. Vol. 288. № 8. P. 5606-5615.

Palmer A.M., DeKosky S.T. Monoamine neurons in aging and Alzheimer's disease // J. Neural. Transm. Gen. Sect. 1993. Vol. 91. P. 135-159.

Pandey S.C., Ugale R., Zhang H. et al. Brain chromatin remodeling: a novel mechanism of alcoholism // J. Neurosci. 2008. Vol. 28. P. 3729-3737.

Pardossi-Piquard R., Checler F. The physiology of the β-amyloid precursor protein intracellular domain AICD // J. Neurochem. 2012. Vol. 120. Suppl. 1. P. 109-124.

Pardossi-Piquard R., Petit A., Kawarai T. et al. Presenilin-dependent transcriptional control of the Aβ-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of βAPP and APLP // Neuron. 2005. Vol. 46.

P. 541-554.
Park M.H., Lee J.K., Choi S. et al. Recombinant soluble neprilysin reduces amyloid-beta accumulation and improves memory impairment in Alzheimer's disease mice // Brain Res. 2013. Vol. 1529. P. 113-124.
Parkin E.T., Watt N.T., Hussain I. et al. Cellular prion protein regulates β-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. Vol. 104. P. 11062-11067.
Parvathy S., Hussain I., Karran E.H. et al. Cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by α-secretase occurs at the surface of neuronal cells // Biochemistry. 1999. Vol. 38. P. 9728-9734.
Pearson H.A., Peers C. Physiological roles for amyloid beta peptides // J. Physiol. 2006. Vol. 575. P. 5-10.
Pedersen W.A., McMillan P.J., Kulstad J.J. et al. Rosiglitazone attenuates learning and memory deficits in Tg2576 Alzheimer mice // Exp. Neurol. 2006. Vol. 199. P. 265-273.
Perez A., Morelli L., Cresto J.C., Castano E.M. Degradation of soluble amyloid b-peptides 1-40, 1-42, and the Dutch variant 1-40Q by insulin degrading enzyme from Alzheimer disease and control brains // Neurochem. Res. 2000. Vol. 2. P. 247-255.
Perry T.A., Greig N.H. A new Alzheimer's disease interventive strategy: GLP-1 // Curr. Drug. Targets. 2004. Vol. 5. P. 565-571.
Pfefferkorn T., Wiessner C., Allegrini P.R. et al. Plasminogen activation in experimental permanent focal cerebral ischemia // Brain Res. 2000. Vol. 882. P. 19-25.
Pluta R., Jabłoński M., Ułamek-Kozioł M. et al. Sporadic Alzheimer's disease begins as episodes of brain ischemia and ischemically dysregulated Alzheimer's disease genes // Mol. Neurobiol. 2013. Vol. 48. № 3. P. 500-515.
Postina R., Schroeder A., Dewachter I. et al. A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model // J. Clin. Invest. 2004. Vol. 113. P. 1456-1464.
Prince J.A., Feuk L., Gu H.F. et al. Genetic variation in a haplotype block spanning IDE influences Alzheimer disease // Hum. Mutat. 2003. Vol. 22. P. 363-371.
Qing H., He G., Ly P.T. et al. Valproic acid inhibits Aβ production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models // J. Exp. Med. 2008. Vol. 205. P. 2781-2789.
Qiu W.Q., Walsh D.M., Ye Z. et al. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid b-protein by degradation // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. P. 32730-32738.
Racchi M., Govoni S. The pharmacology of amyloid precursor protein processing // Exp. Gerontol. 2003. Vol 38. P. 145-157.
Rangan S.K., Liu R., Brune D. et al. Degradation of b-amyloid by proteolytic antibody light chains // Biochemistry. 2003. Vol. 42. P. 14328-14334.
Riemenschneider M., Konta L., Friedrich P. et al. A functional polymorphism within plasminogen activator urokinase (PLAU) is associated with Alzheimer's disease // Hum. Mol. Genet. 2006. Vol. 15. P. 2446-2456.
Robert S., Maillet M., Morel E. et al. Regulation of the amyloid precursor protein ectodomain shedding by the 5-HT4 receptor and Epac // FEBS Lett. 2005. Vol. 579. P. 1136-1142.
Rogaev E.I., Sherrington R., Rogaeva E.A. et al. Familial AD in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the AD type 3 gene // Nature. 1995. Vol. 376. P. 775-778.
Roher A.E,. Kasunic T.C., Woods A.S. et al. Proteolysis of Aβ peptide from Alzheimer disease brain by gelatinase A // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994. Vol. 205. P. 1755-1761.
Roher A.E., Weiss N., Kokjohn T.A. et al. Increased Ab peptides and reduced cholesterol and myelin proteins characterize white matter degeneration in Alzheimer's disease // Biochemistry. 2002. Vol. 37. P. 11080-11090.
Roher A.E., Debbins J.P., Malek-Ahmadi M. et al. Cerebral blood flow in Alzheimer's disease // Vasc. Health Risk Manag. 2012. Vol. 8. P. 599-611.
Rushworth J.V., Griffiths H.H., Watt N.T., Hooper N.M. Prion protein-mediated toxicity of amyloid-β oligomers requires lipid rafts and the transmembrane LRP1 // J. Biol. Chem. 2013. Vol. 288. № 13. P. 8935-8951.
Rybnikova E., Gluschenko T., Galeeva A. et al. Differential expression of ADAM15 and ADAM17 metalloproteases in the rat brain after severe hypobaric hypoxia and hypoxic preconditioning // Neurosci. Res. 2012. Vol. 72. № 4. P. 364-373.
Sácha P., Zámecník J., Barinka C. et al. Expression of glutamate carboxypeptidase II in human brain // Neu-

roscience. 2007. Vol. 144. P. 1361-1372.
Sagare A.P., Bell R.D., Zlokovic B.V. Neurovascular dysfunction and faulty amyloid β-peptide clearance in Alzheimer disease // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2012. Vol. 2. № 10. P. a011452.
Sahin U., Weskamp G., Kelly K. et al. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands // J. Cell Biol. 2004. Vol. 164. P. 769-779.
Saito T., Iwata N., Tsubuki S. et al. Somatostatin regulates brain amyloid β peptide Aβ42 through modulation of proteolytic degradation // Nat. Med. 2005. Vol. 11. P. 434-439.
Sakai A., Ujike H., Nakata K. et al. Association of the neprilysin gene with susceptibility to late-onset Alzheimer's disease // Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 2004a. Vol. 17. P. 164-169.
Sakai A., Ujike H., Nakata K. et al. No association between the insulin degrading enzyme gene and Alzheimer's disease in a Japanese population // Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet. 2004b. Vol. 125B. P. 87-91.
Salta E., De Strooper B. Non-coding RNAs with essential roles in neurodegenerative disorders // Lancet Neurol. 2012. Vol. 11. P. 189-200.
Savaskan E., Hock C., Olivieri G. et al. Cortical alterations of angiotensin converting enzyme, angiotensin II and AT1 receptor in Alzheimer's dementia // Neurobiol. Aging. 2001. Vol. 22. P. 541-546.
Sayre L.M., Zelasko D.A., Harris P.L. et al. 4-Hydroxynonenal-derived advanced lipid peroxidation end products are increased in Alzheimer's disease // J. Neurochem. 1997. Vol. 68. P. 2092-2097.
Selkoe D.J. Preventing Alzheimer's disease // Science. 2012. Vol. 337. № 6101. P. 1488-1492.
Schilling S., Zeitschel U., Hoffmann T. et al. Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Aβ and Alzheimer's disease-like pathology // Nat. Med. 2008. Vol. 14. P. 1106-1111.
Shankar G.M., Li S., Mehta T.H. et al. Amyloid-β protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory // Nat. Med. 2008. Vol .14. P. 837-842.
Shen J., Bronson R.T., Chen D.F. et al. Skeletal and CNS defects in Presenilin-1-deficient mice // Cell. 1997. Vol. 89. P. 629-639.
Sherrington R., Rogaev E.I., Liang Y. et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial AD // Nature. 1995. Vol. 375. P. 754-760.
Shi H., Belbin O., Medway C. et al. Genetic variants influencing human aging from late-onset Alzheimer's disease (LOAD) genome-wide association studies (GWAS) // Neurobiol. Aging. 2012. Vol. 33. № 8. P. 1849.e5-18.
Shibata N., Ohnuma T., Higashi S. et al. Genetic association between matrix metalloproteinase MMP-9 and MMP-3 polymorphisms and Japanese sporadic Alzheimer's disease // Neurobiol. Aging. 2005. Vol. 26. P. 1011-1014.
Shirotani K., Edbauer D., Prokop S. et al. Identification of distinct g-secretase complexes with different APH-1 variants // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279. P. 41340-41345.
Simons M., de Strooper B., Multhaup G. et al. Amyloidogenic processing of the human amyloid precursor protein in primary cultures of rat hippocampal neurons // J. Neurosci. 1996. Vol. 16. № 3. P. 899-908.
Sousa J.C., Cardoso I., Marques F. et al. Transthyretin and Alzheimer's disease: where in the brain? // Neurobiol. Aging. 2007. Vol. 28. № 5. P. 713-718.
Stargardt A., Gillis J., Kamphuis W. et al. Reduced amyloid-β degradation in early Alzheimer's disease but not in the APPswePS1dE9 and 3xTg-AD mouse models // Aging Cell. 2013. Vol. 12. № 3. P. 499-507.
Sun B., Zhou Y., Halabisky B. et al. Cystatin C-cathepsin B axis regulates amyloid beta levels and associated neuronal deficits in an animal model of Alzheimer's disease // Neuron. 2008. Vol. 60. P. 247-257.
Takahashi M., Fukuda K., Shimada K. et al. Localization of rat endothelin converting enzyme to vascular endothelial cells and some secretory cells // Biochem. J. 1995. Vol. 311. P. 657-665.
Tanaka S., Shiojiri S., Takahashi Y. et al. Tissue-specific expression of three types of β-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1989. Vol. 165. P. 1406-1414.
Taru H., Yoshikawa K., Suzuki T. Suppression of the caspase cleavage of β-amyloid precursor protein by its cytoplasmic phosphorylation // FEBS Lett. 2004. Vol. 567. P. 248-252.
Thathiah A., Horré K., Snellinx A. et al. β-arrestin 2 regulates Aβ generation and γ-secretase activity in Alzheimer's disease // Nat. Med. 2013. Vol. 19. № 1. P. 43-49.
Thinakaran G., Kitt C.A., Roskams A.J. et al. Distribution of an APP homolog, APLP2, in the mouse olfactory system: a potential role for APLP2 in axogenesis // J. Neurosci. 1995. Vol. 15. P. 6314-6326.

Toescu E.C., Verkhratsky A. Ca^{2+} and mitochondria as substrates for deficits in synaptic plasticity in normal brain ageing // J. Cell. Mol. Med. 2004. Vol. 8. P. 181-190.

Tsai K.J., Yang C.H., Lee P.C. et al. Asymmetric expression patterns of brain transthyretin in normal mice and a transgenic mouse model of Alzheimer's disease // Neuroscience. 2009. Vol. 159. № 2. P. 638-646.

Tucker H.M., Kihiko-Ehmann M., Wright S. et al. Tissue plasminogen activator requires plasminogen to modulate amyloid-b neurotoxicity and deposition // J. Neurochem. 2000. Vol. 75. P. 2172-2177.

Tucker H.M., Kihiko-Ehmann M., Estus S. Urokinase-type plasminogen activator inhibits amyloid-b neurotoxicity and fibrillogenesis via plasminogen // J. Neurosci. Res. 2002. Vol. 70. P. 249-255.

Turner A.J., Tanzawa K. Mammalian membrane metallopeptidases: NEP, ECE, KELL, and PEX // FASEB J. 1997. Vol. 11. P. 355-364.

Turner P.R., Bourne K., Garama D. et al. Production, purification and functional validation of human secreted amyloid precursor proteins for use as neuropharmacological reagents // J. Neurosci. Methods. 2007. Vol. 164. P. 68-74.

Tyan S.H., Shih A.Y., Walsh J.J. et al. Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function // Mol. Cell. Neurosci. 2012. Vol. 51. P. 43-52.

Usmani B.A., Harden B., Maitland N.J., Turner A.J. Differential expression of neutral endopeptidase-24.11 (neprilysin) and endothelin-converting enzyme in human prostate cancer cell lines // Clin. Sci. (Lond). 2002. Vol. 103. Suppl. 48. P. 314-317.

Van den Hove D.L., Kompotis K., Lardenoije R. et al. Epigenetically regulated microRNAs in Alzheimer's disease // Neurobiol. Aging. 2013. S0197-4580(13)00550-2 (*in press*).

Van Dijk R., Fischer D.F., Sluijs J.A. et al. Frame-shifted amyloid precursor protein found in Alzheimer's disease and Down's syndrome increases levels of secreted amyloid β40 // J. Neurochem. 2004. Vol. 90. P. 712-723.

Van Nostrand W.E., Porter M. Plasmin cleavage of the amyloid β-protein: alteration of secondary structure and stimulation of tissue plasminogen activator activity // Biochemistry. 1999. Vol. 38. P. 11570-11576.

Vassar R. BACE1: the β-secretase enzyme in Alzheimer's disease // J. Mol. Neurosci. 2004. Vol. 23. P. 105-114.

Venugopal C., Pappolla M.A., Sambamurti K. Insulysin cleaves the APP cytoplasmic fragment at multiple sites // Neurochem. Res. 2007. Vol. 32. № 12. P. 2225-2234.

Vincent B., Checler F. α-Secretase in Alzheimer's disease and beyond: mechanistic, regulation and function in the shedding of membrane proteins // Curr. Alzheimer Res. 2012. Vol. 9. № 2. P. 140-156.

Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V. et al. Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition // Biochem. Soc. Trans. 2002. Vol. 30. P. 552-557.

Walter J., van Echten-Deckert G. Cross-talk of membrane lipids and Alzheimer-related proteins // Mol. Neurodegener. 2013. Vol. 8. № 1. P. 34. [Epub ahead of print].

Wang D.S., Iwata N., Hama E. et al. Oxidized neprilysin in aging and Alzheimer's disease brains // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2003. Vol. 310. P. 236-241.

Wang S., Wang R., Chen L. et al. Expression and functional profiling of neprilysin, insulin-degrading enzyme, and endothelin-converting enzyme in prospectively studied elderly and Alzheimer's brain // J. Neurochem. 2010. Vol. 115. № 1. P. 47-57.

Wang C., Sun B., Zhou Y. et al. Cathepsin B degrades amyloid-β in mice expressing wild-type human amyloid precursor protein // J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287. № 47. P. 39834-39841.

Webster N.J., Green K.N., Settle V.J. et al. Altered processing of the amyloid precursor protein and decreased expression of ADAM 10 by chronic hypoxia in SH-SY5Y: no role for the stress-activated JNK and p38 signalling pathways // Brain Res. Mol. Brain Res. 2004. Vol. 130. P. 161-169.

Wehner S., Siemes C., Kirfel G., Herzog V. Cytoprotective function of sAPPalpha in human keratinocytes // Eur. J. Cell Biol. 2004. Vol. 83. P. 701-708.

Weller R.O., Yow H.Y., Preston S.D. et al. Cerebrovascular disease is a major factor in the failure of elimination of Ab from the aging human brain // Ann. NY Acad. Sci. 2002. Vol. 977. P. 162-168.

Weyer S.W., Klevanski M., Delekate A. et al. APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP // EMBO J. 2012. Vol. 30. P. 2266-2280.

White A.R., Reyes R., Mercer J.F. et al. Copper levels are increased in the cerebral cortex and liver of APP and APLP2 knockout mice // Brain Res. 1999. Vol. 842. P. 439-444.

White A.R., Du T., Laughton K.M. et al. Degradation of the Alzheimer disease amyloid β-peptide by metal-dependent up-regulation of metalloprotease activity // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281. P. 17670-17680.

Whyteside A.R., Turner A.J. Human neprilysin-2 (NEP2) and NEP display distinct subcellular localisations and substrate preferences // FEBS Lett. 2008. Vol. 582. P. 2382-2386.

Wiltfang J., Esselmann H., Cupers P. et al. Elevation of β-amyloid peptide 2-42 in sporadic and familial Alzheimer's disease and its generation in PS1 knockout cells // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 42645-42657.

Wolfe M.S. γ-Secretase inhibitors and modulators for Alzheimer's disease // J. Neurochem. 2012. Vol. 120. Suppl. 1. P. 89-98.

Wolfe M.S. Toward the structure of presenilin/γ-secretase and presenilin homologs // Biochim. Biophys. Acta. 2013. Vol. 1828. № 12. P. 2886-2897.

Wu Z., Sun L., Hashioka S. et al. Differential pathways for interleukin-1β production activated by chromogranin A and amyloid β in microglia // Neurobiol. Aging. 2013. Vol. 34. № 12. P. 2715-2725.

Xie L., Helmerhorst E., Taddei K. et al. Alzheimer's b-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor // J. Neurosci. 2002. Vol. 22. P. RC221.

Xu D., Emoto N., Giaid A. et al. ECE-1: a membrane-bound metalloprotease that catalyzes the proteolytic activation of big endothelin-1 // Cell. 1994. Vol. 78. P. 473-485.

Xu X., Zhou H., Boyer T.G. Mediator is a transducer of amyloid-precursor-protein-dependent nuclear signalling // EMBO Rep. 2011. Vol. 12. № 3. P. 216-222.

Yan P., Hu X., Song H. et al. Matrix metalloproteinase-9 degrades amyloid-β fibrils in vitro and compact plaques in situ // J. Biol. Chem. 2006. Vol. 281. P. 24566-24574.

Yasojima K., Akiyama H., McGeer E.G., McGeer P.L. Reduced neprilysin in high plaque areas of Alzheimer's brain: a possible relationship to deficient degradation of b-amyloid peptide // Neurosci. Lett. 2001. Vol. 297. P. 97-100.

Yildirim E., Zhang Z., Uz T. et al. Valproate administration to mice increases histone acetylation and 5-lipoxygenase content in the hippocampus // Neurosci. Lett. 2003. Vol. 345. P. 141-143.

Yoshiyama Y., Asahina M., Hattori T. Selective distribution of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) in Alzheimer's disease brain // Acta Neuropathol. 2000. Vol. 99. P. 91-95.

Young-Pearse T.L., Bai J., Chang R. et al. A critical function for β-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by *in utero* RNA interference // J. Neurosci. 2007. Vol. 27. P. 14459-14469.

Zhang Z., Deng L., Yu H. et al. Association of angiotensin-converting enzyme functional gene I/D polymorphism with amnestic mild cognitive impairment // Neurosci. Lett. 2012. Vol. 514. № 1. P. 131-135.

Zhao L.N., Long H., Mu Y., Chew L.Y. The Toxicity of Amyloid β Oligomers // Int. J. Mol. Sci. 2012. Vol. 13. № 6. P. 7303-7327.

Zheng H., Jiang M., Trumbauer M.E. et al. β-amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity // Cell. 1995. Vol. 81. P. 525-531.

Zhu G., Wang D., Lin Y.H. et al. Protein kinase C e suppresses Ab production and promotes activation of a-secretase // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001. Vol. 285. P. 997-1006.

Zlokovic B.V. Cerebrovascular effects of apolipoprotein E: implications for Alzheimer disease // JAMA Neurol. 2013. Vol. 70. № 4. P. 440-444.

Zou K., Yamaguchi H., Akatsu H. et al. Angiotensin-converting enzyme converts amyloid β-protein 1-42 (A β_{1-42}) to Aβ_{1-40}, and its inhibition enhances brain A β deposition // J. Neurosci. 2007. Vol. 27. P. 8628-8635.

Zou K., Liu J., Watanabe A. et al. Aβ43 is the earliest-depositing Aβ species in APP transgenic mouse brain and is converted to Aβ41 by two active domains of ACE // Am. J. Pathol. 2013. Vol. 182. № 6. P. 2322-2331.

Изучение амилоидогенеза *in vitro*: значение для разработки диагностики и терапии амилоидозов

З.А. Подлубная, А.Г. Бобылёв

Амилоидозы (конформационные болезни) характеризуются неограниченно растущими белковыми отложениями в виде нерастворимых фибрилл (амилоидов) в разных органах и тканях, образующихся в результате наследственного или приобретенного нарушения сворачивания белков. Накопление амилоидных отложений нарушает структуру и функцию органов и тканей, приводя к летальному исходу (Uversky, Fink, 2001). Амилоиды играют центральную роль в патогенезе болезней, от которых страдают миллионы пациентов (болезнь Альцгеймера, Паркинсона, синдром Дауна, второй тип диабета, прионные болезни, системные амилоидозы и другие). Амилоидозы – главная причина смерти после сердечно-сосудистых и раковых заболеваний, причем их диагностика чаще всего посмертная. Наследственные амилоидозы составляют небольшой процент, а основной – спорадические его формы. Амилоидные отложения обнаруживаются в сосудах, в сердечной и скелетной мускулатуре при кардиомиопатиях, миокардитах, миозитах, включая и амилоидную кардиомиопатию (Барсуков и др., 2005; Сторожаков, Гендлин, 2000). Молекулярные механизмы амилоидозов до конца не выяснены. Их выяснение необходимо для предупреждения амилоидозов, их ранней диагностики и назначения своевременного, эффективного лечения. Используются разные подходы для решения этих задач, и в том числе экспериментальное моделирование, включая и изучение амилоидогенеза *in vitro* в системах разных белков.

Известно более 30 белков, образующих амилоидные фибриллы, таких как τ-белок, хантингтин, амилин, Aβ-пептиды, α-синуклеин, инсулин, лизоцим, миоглобин, транстиретин и др. (Uversky, Fink, 2001). Несмотря на различия в белках-предшественниках амилоидов, образуемые ими амилоидные фибриллы имеют общие свойства: β-складчатую структуру с отдельными β-слоями, ориентированными параллельно главной оси фибриллы; нерастворимость *in vivo*; специфическое связывание с красителями Конго красным и тиофлавином Т (Klunk et al., 1989; Krebs et al., 2005). Белки-предшественники амилоидов, не имеющие β-складчатой структуры, должны претерпевать трансформацию типа «α-спираль – β-складчатость», необходимую для образования амилоидных фибрилл (Uversky, Fink, 2001), что, как правило, требует жестких условий, несовместимых с условиями *in vivo* (низкие значения pH, высокие температуры, длительная инкубация, добавление ряда веществ, не присутствующих в клетке, и другие). К сожалению, процессы, лежа-

Сокращения: КК – Конго красный; ТИФА – твердофазный иммуноферментный анализ; ТТ – тиофлавин Т; ЭМ – электронная микроскопия; NaFL – фуллеренолат натрия.

щие в основе аномальной агрегации белка *in vivo* и ее патологического проявления при болезнях, изучены недостаточно. Выяснение молекулярных механизмов амилоидозов, установление природы белков в составе депозитов и их свойств, развитие терапевтических методов лечения и предупреждения этих заболеваний, а также разработка их прижизненной диагностики являются актуальными задачами. Успешное решение этих задач во многом зависит от фундаментальных знаний амилоидогенеза. Одним из эффективных подходов к решению этих задач наряду с другими подходами является изучение амилоидогенеза в системах *in vitro*: выяснение общих свойств амилоидов, образуемых разными белками, и их различий, открытие факторов, регулирующих их образование и разрушение, их влияния на жизнедеятельность клеток и т.д.

Нами были открыты четыре новых амилоидных белка – цитоскелетные мышечные белки семейства тайтина (Alekseeva et al., 2004). Мы провели *in vitro* исследования способности этих белков формировать амилоидные агрегаты в сравнении с Аβ-пептидами мозга. Эти белки (тайтин, Х-, С-, Н-белки), связанные в саркомере с миозиновыми нитями, играют важную роль в формировании структуры саркомеров, механизме сокращения, его регуляции и в процессах сигнализации (Вихлянцев, Подлубная, 2007). Поскольку, как отмечено выше, разные белки-предшественники амилоидов имеют сходные свойства, то возможны и сходные подходы к разрушению их амилоидов. Разработка таких подходов на системах белков семейства тайтина имеет свои преимущества: значительные количества этих белков для экспериментов (они занимают третье место по количеству в саркомере после миозина и актина), высокое (~90%) исходное содержание β-складчатости в структуре их молекул, необходимой для формирования амилоидных фибрилл, а значит и высокая скорость формирования амилоидов этими белками (Марсагишвили, 2007). Все это подтвердили наши исследования. С помощью электронной микроскопии (ЭМ) было показано (Марсагишвили, 2007; Марсагишвили и др., 2005), что исследуемые нами белки Х-, С- и Н, как и другие известные амилоидные белки (Uversky, Fink, 2001), способны формировать разные амилоидные агрегаты: аморфные агрегаты, протофибриллы, спирально скрученные ленты, линейные фибриллы и их пучки (рис. 1, см. рис. 3, 6, 7). При электронно-микроскопическом сравнении амилоидных фибрилл Х-белка с амилоидными фибриллами Аβ-пептидов было обнаружено их структурное сходство (см. рис. 7). Аβ(25-35)-пептид и Аβ(1-42)-пептид образуют, подобно Х-белку (см. рис. 7В), спирально скрученные ленты длиной в несколько микрон и диаметром 25–27 нм с вариабельным осевым периодом 170–250 нм (см. рис. 7А, Б). Обнаруженное сходство (Podlubnaya et al., 2006; Podolsky et al., 2007) позволило высказать предположение о возможности сходных подходов к разрушению амилоидов Х-белка и Аβ-пептидов. Амилоидная природа наблюдаемых агрегатов белков семейства тайтина скелетных и сердечных мышц была подтверждена не только электронной микроскопией, но и поляризационной и люминесцентной микроскопией и спектральными методами с использованием специфических красителей Конго красного (КК) и тиофлавина Т (ТТ) (Марсагишвили, 2007; Марсагишвили и др., 2005; Marsagishvili, Podlubnaya, 2005). Основным методом выявления амилоидной природы фибрилл, образуемых разными белками, является

их способность специфически взаимодействовать с этими красителями (Klunk et al., 1989; Krebs et al., 2005; LeVine, 1995). Они используются и для исследования амилоидогенеза разных белков *in vitro*, и в клинической практике для определения амилоидных отложений *in vivo*. При окрашивании КК амилоидных структур, формируемых исследуемыми белками, мы наблюдали двойное лучепреломление в поляризационном микроскопе, а при окрашивании их ТТ – желто-зеленую флуоресценцию в люминесцентном микроскопе. При спектральных исследованиях интенсивность флуоресценции ТТ в присутствии амилоидных фибрилл Х-, Н- и С-белков и тайтина возрастала в ~10, ~9, ~7 и ~5 раз соответственно по сравнению с интенсивностью флуоресценции красителя в присутствии этих белков в молекулярной форме (Марсагишвили, 2007; Марсагишвили и др., 2005). При измерении спектральных характеристик раствора КК в присутствии фибрилл тайтина, Х-, С- и Н-белков наблюдался сдвиг спектра поглощения красителя в длинноволновую область от ~490 нм к ~500 нм (Марсагишвили, 2007; Марсагишвили и др., 2005), что также характеризует специфичность связывания амилоидных фибрилл с КК (Klunk et al., 1989).

В связи с тем, что амилоидные отложения находят в кровеносных сосудах, мы продолжили исследования, направленные на поиск новых амилоидных белков в мышцах, и в частности изучили амилоидные свойства гладкомышечного белка

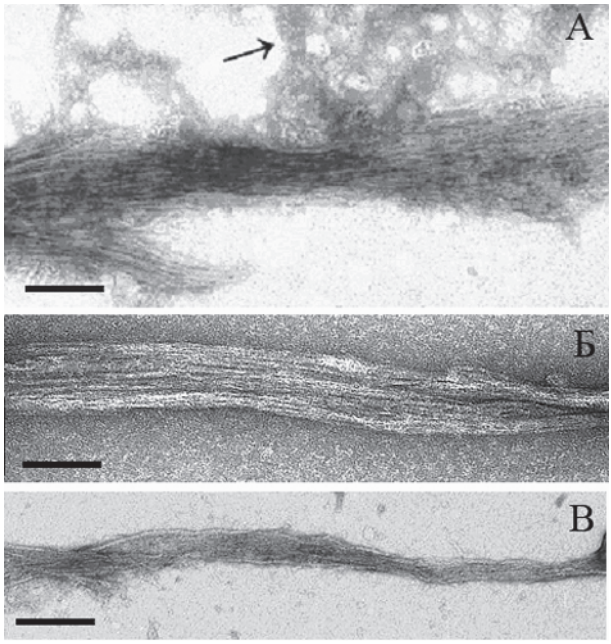


Рис. 1. Электронные микрофотографии амилоидных агрегатов белков семейства тайтина

А – пучки линейных фибрилл Х-белка, сформированные в 25 мМ NaCl, 10 мМ Hepes, pH 7,0. Видны аморфные агрегаты (стрелка) и фибриллы. Б – пучки фибрилл С-белка скелетных мышц кролика, сформированные в растворе, содержащем 0,15 М глицин-KOH, pH 7,5. В – ленточные фибриллы Н-белка скелетных мышц кролика, сформированные в растворе, содержащем 0,05 М $MgCl_2$, 10 мМ имидазола, pH 7,0. Температура 4–35ºС. Негативное окрашивание 2-процентным водным раствором уранилацетата. Шкала 100 нм

смитина (аналога тайтина скелетных и сердечной мышц). Поскольку смитин имеет молекулярную структуру, подобную тайтину скелетных и сердечной мышц (Kim, Keller, 2002), мы предположили, что смитин также может легко формировать амилоиды.

С помощью ЭМ было показано, что смитин способен формировать аморфные агрегаты (Бобылева и др., 2010), а также пучки линейных фибрилл длиной ~0,5 мкм и более, шириной до 100 нм (рис. 2), как и другие известные амилоидогенные белки (Chiti et al., 1999; Goldsbury et al., 2000; O'Nuallain et al., 2004; Uversky, Fink, 2001; Подлубная, Марсагишвили, 2008), в том числе и мышечные белки семейства тайтина.

На рис. 3 приведены пучки линейных амилоидных фибрилл, образуемых Aβ(1-42)-пептидом мозга и тайтином. На электронных микрофотографиях видно, что тайтин и Aβ(1-42)-пептид формируют сходные по структуре пучки амилоидных фибрилл, подобные смитину (рис. 2Б).

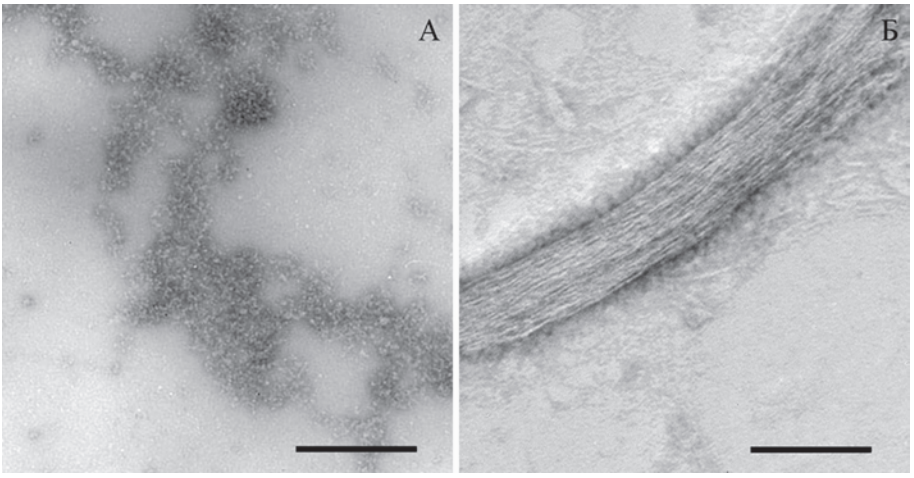


Рис. 2. Электронные микрофотографии амилоидных агрегатов смитина (гладкомышечного тайтина)

А – аморфные агрегаты смитина гладких мышц желудка кролика, сформированные в растворе, содержащем 0,05 М глицин-KOH, pH 7,0. Б – пучки линейных фибрилл смитина гладких мышц желудка кролика, сформированные в растворе, содержащем 0,15 М глицина-KOH, pH 7,0. Температура 4°C. Негативное окрашивание 2-процентным водным раствором уранилацетата. Шкала 100 нм

При спектральных исследованиях интенсивность флуоресценции тиофлавина Т в присутствии аморфных агрегатов смитина возрастала в ~2 раза (рис. 4А), а в присутствии пучков смитина в ~10 раз (рис. 4Б) по сравнению с интенсивностью флуоресценции красителя в присутствии этого белка в молекулярной форме.

При измерении спектральных характеристик раствора КК в присутствии аморфных агрегатов и пучков фибрилл смитина наблюдался сдвиг спектра поглощения красителя в длинноволновую область от ~490 нм к ~500 нм (рис. 5), что также является характерной чертой при связывании КК с амилоидами (Klunk et al., 1989).

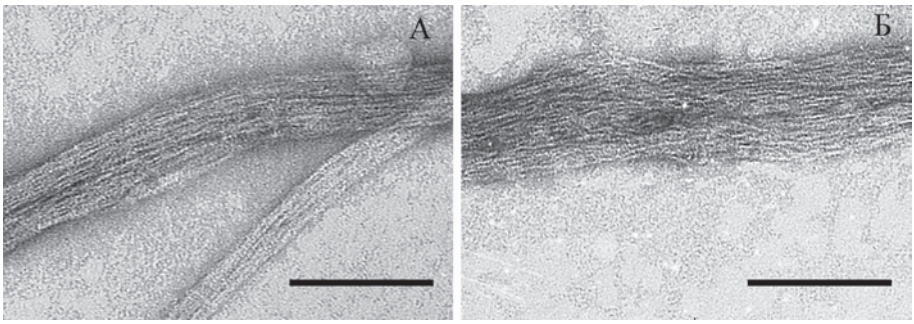


Рис. 3. Электронные микрофотографии пучков линейных фибрилл Aβ(1-42)-пептида мозга и смитина

А – пучки линейных фибрилл Aβ(1-42)-пептида мозга, сформированные в растворе 30 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7,0. Температура 37°C. Б – пучки линейных фибрилл тайтина, сформированные в растворе, содержащем 0,15 М глицина-KOH, pH 7,5. Температура 4°C. Негативное окрашивание 2-процентным водным раствором уранилацетата. Шкала 100 нм

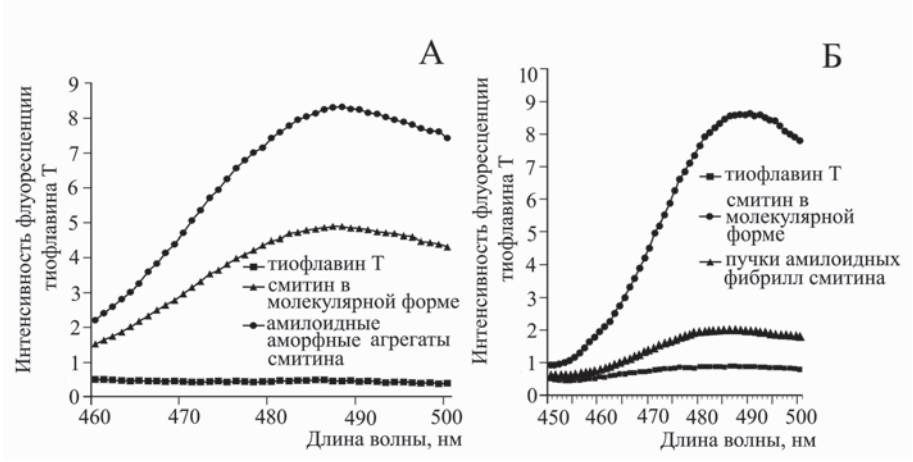


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции тиофлавина Т в присутствии амилоидных агрегатов смитина

А – амилоидные аморфные агрегаты смитина (0,05 М глицин-KOH, pH 7,0). Б – пучки амилоидных фибрилл смитина (0,15 М глицин-KOH, pH 7,0)

Проведенные исследования указывают на специфичность связывания красителей с агрегатами смитина, подтверждая их амилоидную природу.

Нами было показано, что смитин образует амилоиды *in vitro* и, как открытые нами ранее амилоидные белки семейства тайтина, может быть потенциальным участником развития амилоидозов *in vivo.*

Процессы формирования амилоидных фибрилл разными белками *in vitro* характеризуются разной скоростью (Kim et al., 2002). Она зависит от состава растворов, температуры, pH, ионной силы и др. Однако наибольшее влияние оказывает, скорее всего, тип вторичной структуры белка. Если белок содержит высокий про-

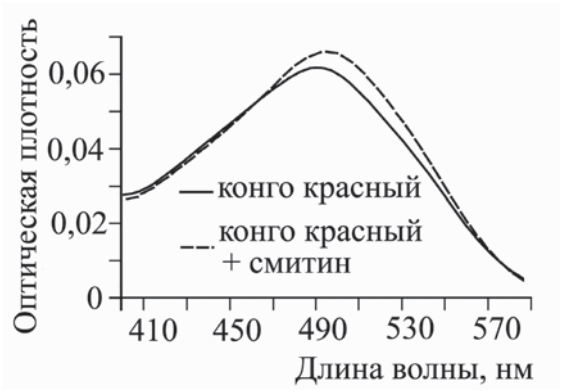


Рис. 5. Спектры поглощения красителя Конго красного в отсутствие (сплошная линия) и в присутствии (пунктирная линия) амилоидных агрегатов смитина (0,15 М глицин-КОН, pH 7,0)

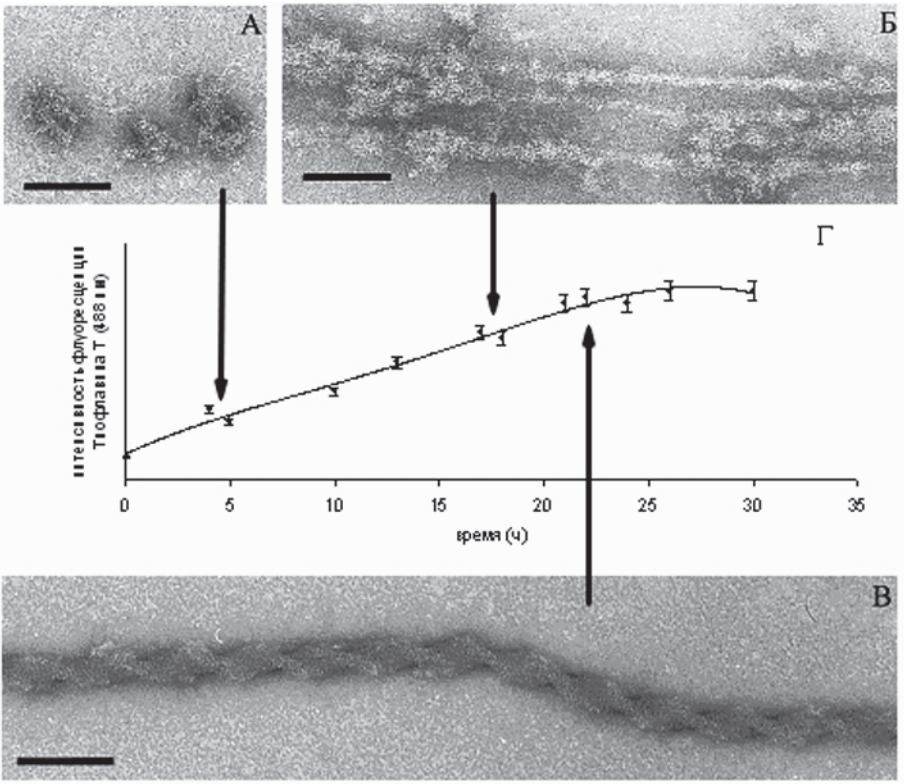


Рис. 6. Динамика формирования амилоидных агрегатов Х-белка. Электронные микрофотографии амилоидов Х-белка и интенсивность флуоресценции тиофлавина Т в их присутствии

А – аморфные агрегаты Х-белка (4 часа диализа). Б – линейные короткие фибриллы и аморфные агрегаты Х-белка (17 часов диализа). В – спирально скрученные ленточные фибриллы Х-белка (22 часа диализа), сформированные в растворе, содержащем 30 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7,0. Негативное окрашивание 2-процентным водным раствором уранилацетата. Шкала 100 нм. Г – скорость образования амилоидных фибрилл Х-белка

цент α-спирали, то требуется трансформация типа «α-спираль – β-складчатость». При этом *in vitro* приходится использовать условия, несовместимые с условиями *in vivo* (денатурирующие вещества, низкие значения pH, высокие температуры, длительная инкубация, добавление ряда веществ, не присутствующих в клетке и т.п.). Эти условия приводят к образованию β-складчатости, характерной для амилоидных фибрилл. Согласно литературным и нашим данным (Марсагишвили, 2007), молекулы белков семейства тайтина уже содержат 90% β-складчатой структуры, и для них нет необходимости в изменении вторичной структуры, вследствие чего они должны быстро формировать амилоиды *in vitro*. Образование ими амилоидных фибрилл происходит в мягких условиях (pH 7,0, температура 5–30°C, ионная сила, близкая к физиологической) и быстрее, чем в случае других амилоидных белков (Марсагишвили и др., 2006). Это преимущество и было продемонстрировано нами на примере Х-белка, так как он образует наиболее упорядоченные амилоидные фибриллы (спирально скрученные ленты) и методом электронной микроскопии можно визуально оценить, как происходит процесс фибриллообразования. Параллельно в этих экспериментах динамика образования амилоидных фибрилл Х-белком оценивалась по их связыванию с флуоресцентным красителем ТТ, то есть по увеличению интенсивности флуоресценции красителя при спектрофлуорометрических измерениях (рис. 6). В образцах белка происходило накопление амилоидных фибрилл. Не происходило значительного возрастания интенсивности флуоресценции ТТ в первые часы инкубации (1–4 часа), так как фибриллы еще не были сформированы, а присутствовали только аморфные агрегаты (см. рис. 6А). При дальнейшей инкубации интенсивность флуоресценции ТТ возрастала, что соответствовало образованию амилоидных протофибрилл (см. рис. 6Б), среди которых наблюдались и аморфные агрегаты. После 22 часов интенсивность флуоресценции красителя при связывании со зрелыми фибриллами достигала плато, что согласуется с данными электронной микроскопии, демонстрирующей присутствие хорошо сформированных спирально скрученных ленточных фибрилл Х-белка (см. рис. 6В). Они наблюдаются и после 26 часов диализа.

Накопление амилоидов в клетках и тканях организма может приводить к их гибели, и важно не допустить агрегацию и накопление амилоидов в организме. Поэтому наши дальнейшие исследования были направлены на поиск подходов к разрушению амилоидов и предотвращению их образования.

Для выяснения возможных подходов к разрушению амилоидных фибрилл, образуемых Х-белком семейства тайтина в сравнении с Аβ(1-42) и Аβ(25-35)-пептидами мозга, было проведено изучение эффекта тетрациклина и фуллерена C_{60} на структуру их фибриллярных агрегатов (Марсагишвили и др., 2005; Подлубная, Марсагишвили, 2007). Мышечный Х-белок является наиболее удобной моделью для этих экспериментов, благодаря способности строить упорядоченные спирально скрученные ленты, сходные с амилоидными фибриллами Аβ-пептидов мозга (рис. 7А, Б).

Нами показано, что антибиотик тетрациклин разрушает фибриллы, формируемые белками семейства тайтина. На снимках видны фрагменты фибрилл Х-белка после действия тетрациклина длиной ~24–64 нм (рис. 8Б) и отдельные молекулы Х-белка. Действие тетрациклина на фибриллы Х-белка подобно его действию на

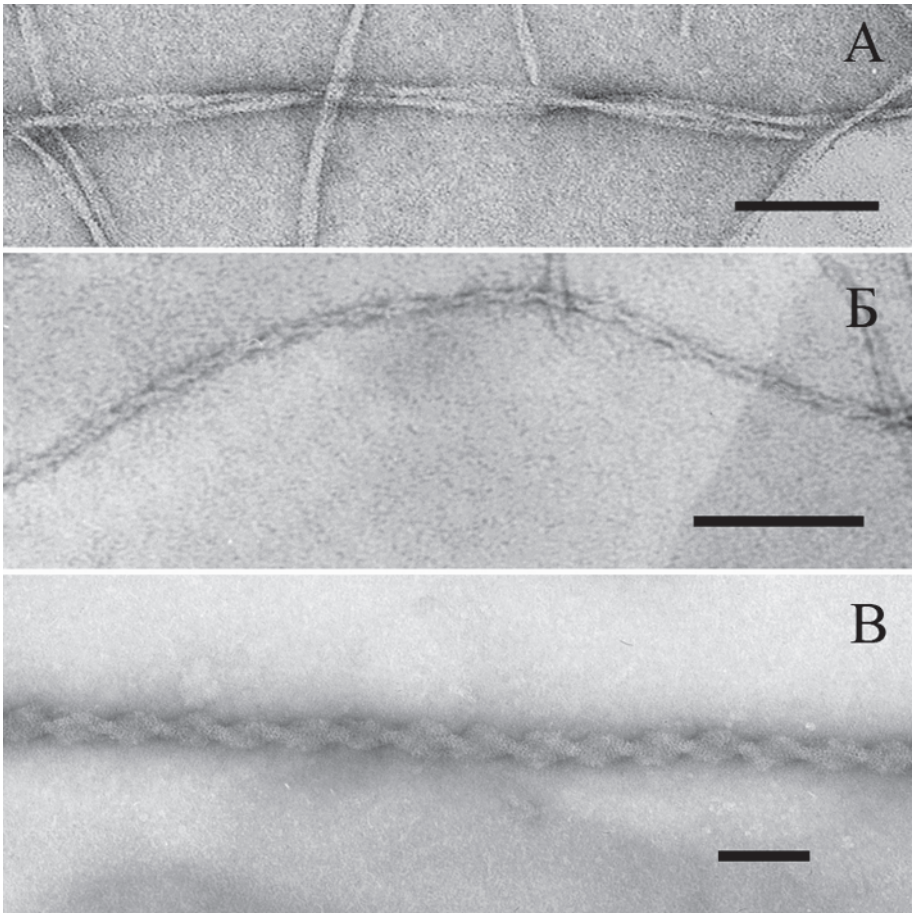


Рис. 7. Электронные микрофотографии

А, Б – спирально скрученные ленточные фибриллы Aβ(1-42)-пептида мозга, сформированные в растворе, содержащем 30 мМ KCI, 10 мМ имидазола, pH 7,0. Температура 37°C. В – спирально скрученные ленточные фибриллы мышечного Х-белка, сформированные в растворе, содержащем 30 мМ KCI, 10 мМ имидазола, pH 7,0. Температура 4°C. Негативное окрашивание 2-процентным водным раствором уранилацетата. Шкала 100 нм

амилоиды Aβ-пептида и τ-белка при болезни Альцгеймера, на депозиты хантингтина при болезни Хантингтона, а также на амилоидные фибриллы прионного белка (Forloni et al., 2001).

В последнее время фуллерены (рис. 9) рассматривают как лекарственные препараты (Пиотровсий, Киселев, 2006), в том числе и для лечения нейродегенеративных болезней. Важность использования фуллерена C_{60} в этих исследованиях обусловлена наличием у него таких положительных свойств, как нейропротекция и сильные антиоксидантные свойства (Dugan et al., 1996; Chiang et al., 1995; McEwen et al., 1992). Невизуальным методом показано ингибирующее влияние производного фуллерена C_{60} (1,2-(диметоксиметано)фуллерен) на фибриллогенез Aβ(11-25)-пептида и Aβ(1-40)-пептида *in vitro* (Kim, Lee, 2003).

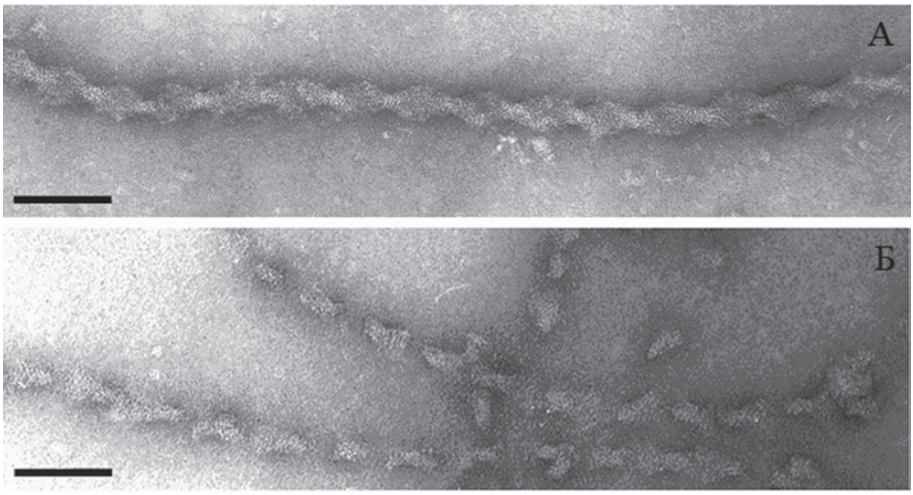


Рис. 8. Электронные микрофотографии

А – спирально скрученные ленточные фибриллы Х-белка, сформированные в растворе, содержащем 30 мМ KCI, 10 мМ имидазола, pH 7,0. Б – фрагменты фибрилл Х-белка после действия тетрациклина. Весовое соотношение белка и тетрациклина 1:1. Температура 4°С. Негативное окрашивание 2-процентным водным раствором уранилацетата. Шкала 100 нм

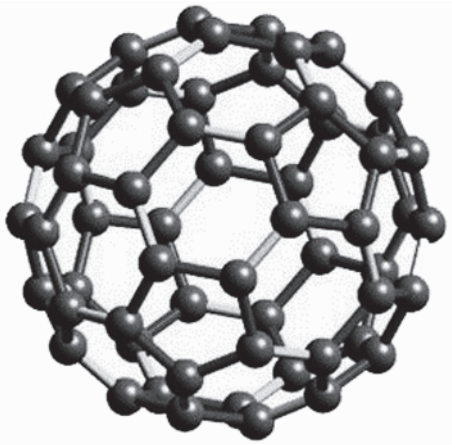


Рис. 9. Структура фуллерена C_{60}

Молекула имеет форму правильного усеченного икосаэдра, в котором атомы углерода располагаются на сферической поверхности в вершинах 20 правильных шестиугольников и 12 правильных пятиугольников, так что каждый шестиугольник граничит с 3 шестиугольниками и 3 пятиугольниками, а каждый пятиугольник граничит только с шестиугольниками. Диаметр молекулы C_{60} равен примерно 0,71 нм при молекулярной массе 720 дальтон

Биологическое действие фуллеренов обуславливается прежде всего тем, что, несмотря на большое количество атомов, молекула фуллерена компактна. Диаметр молекулы C_{60} равен ~0,71 нм (при молекулярной массе 720 дальтон), что сравнимо с размерами таких органических молекул, как бензол, фенилаланин и меньше размера более сложных молекул, таких как АМФ (Пиотровский, 2005).

Однако серьезным осложняющим фактором при исследовании биологических свойств самого фуллерена и большинства его производных является их практически полная нерастворимость в полярных растворителях (Beck, Mandy, 1997; Ruoff et al., 1993; Sivaraman et al., 1992). Для решения этой проблемы используются следующие подходы: стабильные коллоидные растворы фуллеренов в воде (Andrievsky et al., 2009), нековалентные комплексы фуллеренов с гидрофильными органическими молекулами, в том числе с полимерами, синтезированные водорастворимые производные фуллеренов.

Эти подходы имеют свои достоинства и недостатки. В коллоидных растворах фуллеренов, как и в некоторых нековалентных комплексах, молекулы фуллерена находятся в виде ассоциатов (Пиотровский, 2005). Присоединение радикала к молекуле фуллерена приводит к изменению природы самого фуллеренового ядра, причем чем больше степень замещения, тем более выражено это изменение (Сидоров, Болталина, 2002). Поэтому физические, химические и биологические свойства фуллеренов, а также их ковалентных производных могут принципиально различаться. Кроме того, введение объемных заместителей может стерически блокировать само фуллереновое ядро, что также скажется на его способности проявлять собственные биологические свойства.

Методом ЭМ мы впервые продемонстрировали антиамилоидогенную способность гидратированного фуллерена C_{60} (C_{60} HyFn) по отношению к фибриллам Aβ(25-35)-пептида, Aβ(1-42)-пептида и Х-белка (Podlubnaya et al., 2006; Podolsky et al., 2007; Подлубная, Марсагишвили, 2007; Марсагишвили и др., 2007; Подлубная и др., 2006; Макарова и др., 2007; Podlubnaya et al., 2007). Добавление C_{60} HyFn к спирально скрученным лентам Х-белка в весовом соотношении 1:2 приводило к их декорации сферическими частицами фуллерена, уменьшению длины и ширины лент (данные не показаны). Более того, в присутствии C_{60} HyFn Х-белок в молекулярной форме не формировал амилоидных фибрилл. Добавление C_{60} HyFn к амилоидам Aβ(25-35)-пептида в молярном отношении 15:6 и инкубация их в течение 24 часов при 37°С приводит к декорации его спирально скрученных лент сферическими частицами фуллерена, уменьшению их диаметра, длины и количества (рис. 10Д) по сравнению с контролем (рис. 10А, Б). Мы наблюдали аналогичный эффект C_{60} HyFn и на амилоиды Aβ(1-42)-пептида. Следует отметить, что тетрациклин и C_{60} HyFn не только разрушают амилоиды Х-белка и Aβ-пептидов, но и предотвращают их образование, что важно в терапии амилоидозов. Полученные результаты подтверждают наше предположение о возможности сходных подходов к разрушению амилоидов Х-белка семейства тайтина и Aβ-пептидов мозга в связи с их общими структурными свойствами. Эти подходы могут быть предварительно разработаны на системах саркомерных белков семейства тайтина в силу их достаточных количеств и экономии финансовых затрат на исследования в сравнении с затратами на амилоидные пептиды. Нужно отметить и интенсификацию исследований вследствие уменьшения временных затрат на формирование амилоидов белками семейства тайтина. Следует также указать, что антиамилоидогенная активность фуллеренов, наноразмерных частиц, открывает перспективы для разработки новой медицинской нанотехнологии для терапии амилоидозов, и в частности для болез-

ни Альцгеймера. Полученные нами данные показали, что введение в мозг крысам C_{60} HyFn положительно влияет на когнитивные процессы в норме. Этот результат свидетельствует об отсутствии нейротоксичности фуллерена C_{60}. Более того, имеется соответствие между описанным выше антиамилоидогенным действием C_{60} HyFn на амилоиды Aβ(25-35)-пептида *in vitro* и его способностью предотвращать нарушение решения когнитивных вероятностных задач у экспериментальных животных, индуцированное Aβ(25-35)-пептидом (Podolsky et al., 2007). Эти данные позволяют рассматривать C_{60} HyFn как потенциальные лекарства при лечении амилоидозов. Однако этому препятствует его низкая растворимость в воде. В связи с этим нами были исследованы антиамилоидные свойства ряда водорастворимых производных фуллерена C_{60} (натриевой соли поликарбоксильного производного фуллерена C_{60} ($C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$), фуллеренолата натрия (NaFL), C_{60}-аланина и нитроксипроизводных фуллерена C_{60} (C_{60}-NO_2-пролина, C_{60}-$(NO_2)_2$-пролина, C_{60}-NO_2-пролин-NO_2), а также комплексов фуллерена C_{60} с поливинилпирролидоном (C_{60}/ПВП) (м.м. ПВП 10000 и 25000).

Методом ЭМ мы исследовали антиамилоидные свойства $C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$ (рис. 11А) (Марсагишвили и др., 2009; Бобылёв и др., 2009). Данное производное

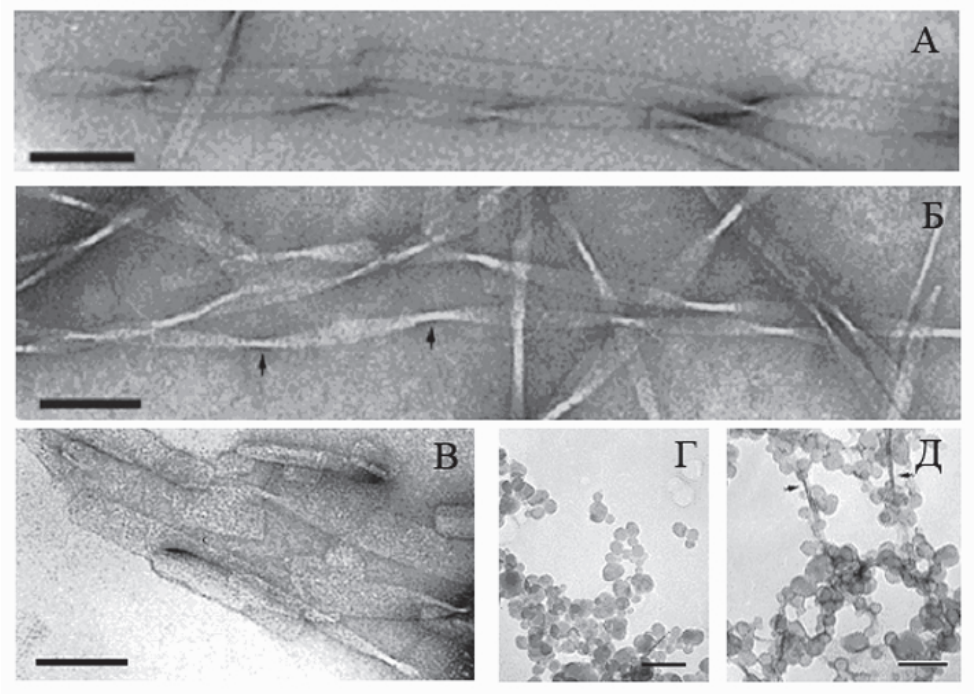


Рис. 10. Электронные микрофотографии Aβ(25-35)-пептида в присутствии и отсутствие гидратированного фуллерена C_{60}

А, Б – амилоидные спирально скрученные ленточные фибриллы. В – амилоидные листовые структуры Aβ(25-35)-пептида, инкубированного в течение 24 часов при 35°С. Г – сферические агрегаты гидратированного фуллерена и их скопления. Д – инкубация Aβ(25-35)-пептида с гидратированным фуллереном C_{60} в молярном соотношении 6:15 (стрелками показаны тонкие фибриллы). Негативное окрашивание 2-процентным водным раствором уранилацетата. Шкала 100 нм

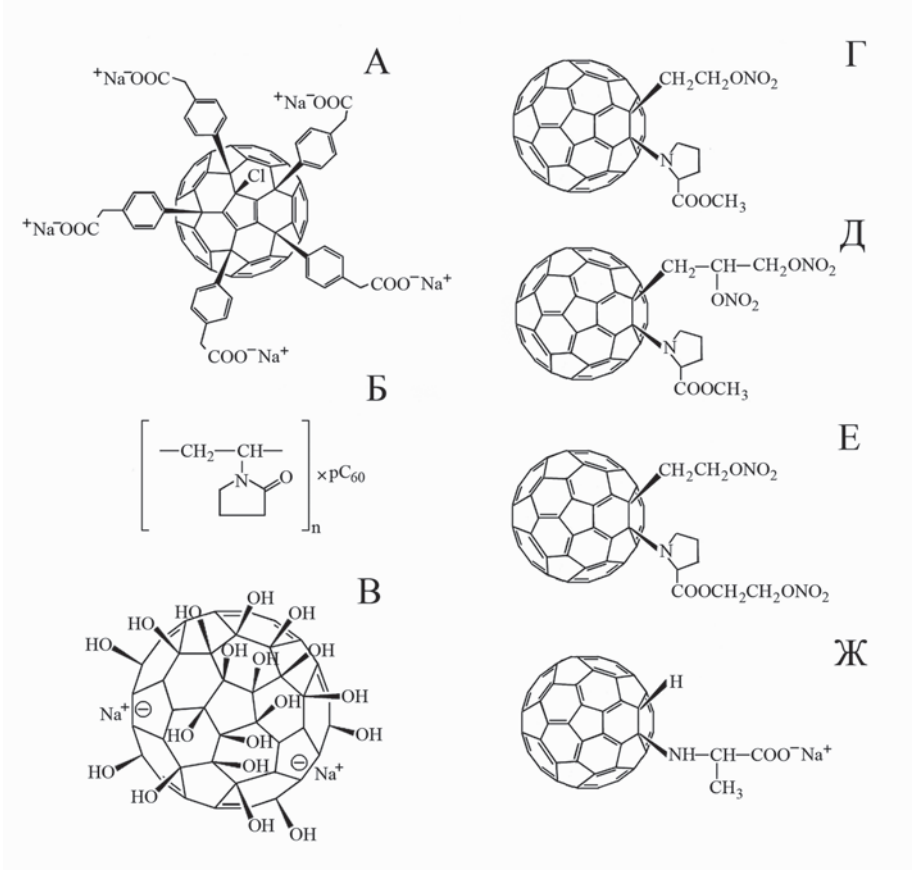


Рис. 11. Структура исследованных нами растворимых производных фуллерена C_{60}

А – натриевая соль поликарбоксильного производного фуллерена C_{60} ($C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$). Б – комплекс фуллерена C_{60} с поливинилпирролидоном (C_{60}/ПВП). В – фуллеренолат натрия (NaFL). Г – C_{60}-NO_2-пролин. Д – C_{60}-$(NO_2)_2$-пролин. Е – C_{60}-NO_2-пролин-NO_2. Ж – C_{60}-аланин

фуллерена C_{60}, в отличие от C_{60} HyFn, хорошо растворяется в полярных растворителях и не образует агрегаты *in vitro*.

Добавление $C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$ к спирально скрученным ленточным амилоидным фибриллам Х-белка приводило к их полному разрушению. Производное фуллерена $C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$ не только разрушало амилоидные фибриллы, но и предотвращало их образование. Аналогичный эффект это производное оказывало на амилоидные фибриллы Аβ(1-42)-пептида мозга. В ходе ЭМ-исследования было показано, что данное производное фуллерена разрушало фибриллы Аβ(1-42)-пептида мозга и предотвращало образование новых фибрилл. Это важно, поскольку современная превентивная стратегия медицины направлена на предотвращение перехода мягких когнитивных нарушений и начальных форм болезни Альцгеймера в развитые формы этой болезни.

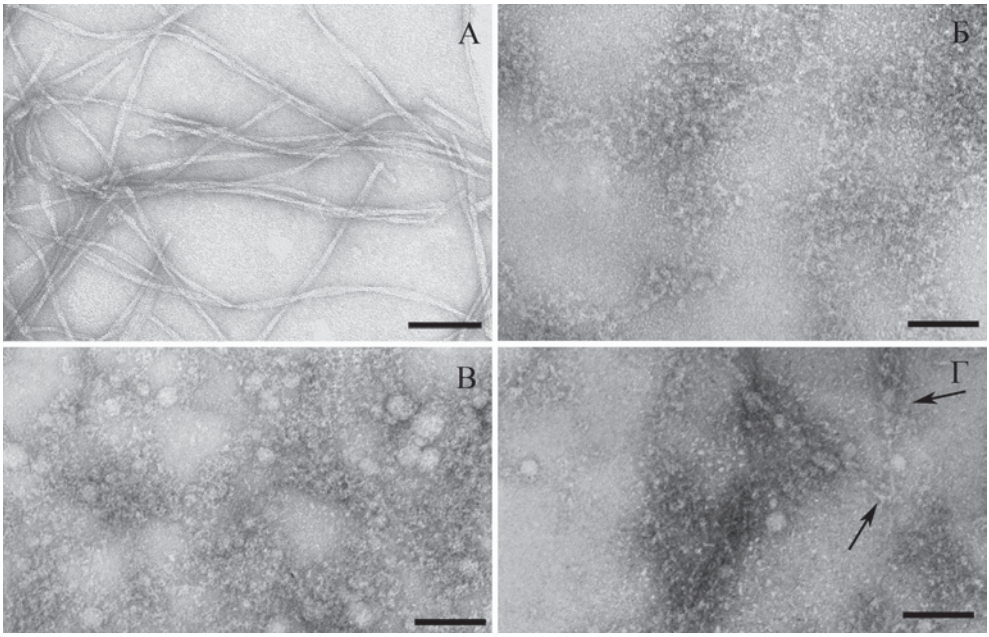


Рис. 12. Электронные микрофотографии Aβ(1-42) в присутствии и отсутствие NaFL
А – NaFL. Б – спирально скрученные ленточные фибриллы Aβ(1-42)-пептида, сформированные в растворе, содержащем 30 мМ KCl, 10 мМ имидазола, pH 7,0. Aβ(1-42)-пептид в присутствии добавленного до (В) и после (Г) формирования амилоидных фибрилл. Инкубация 24 ч при 37°

Электронно-микроскопическое исследование антиамилоидного действия NaFL (C_{60} ($Na_4[C_{60}(OH)_{\sim 30}]$)) (рис. 11В) на фибриллы Х-белка и Aβ(1-42)-пептида мозга показало, что он, так же как $C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$, разрушал зрелые фибриллы Aβ(1-42)-пептида мозга, а также предотвращал их образование (рис. 12В, Г) (Bobylev et al., 2011). Аналогичный эффект NaFL оказывал на амилоиды Х-белка (Бобылев, 2011).

Антиамилоидный эффект на исследуемые фибриллы был выявлен у C_{60}/ПВП (м.м. ПВП 10000 и 25000) (рис. 13) (Бобылёв и др. 2009). Следует отметить, что, по данным электронной микроскопии, C_{60}/ПВП в солевом растворе образует сферические агрегаты (см. рис. 13А), подобные агрегатам C_{60}HyFn. Однако, в отличие от них, агрегаты C_{60}/ПВП имеют меньший диаметр (~5–30 нм) и количество этих агрегатов значительно меньше в поле зрения, чем у C_{60}HyFn.

Исследование антиамилоидных свойств C_{60}-аланина (см. рис. 11Ж) и нитроксипроизводных фуллерена C_{60} (C_{60}-NO_2-пролин (см. рис. 11Г), C_{60}-$(NO_2)_2$-пролин (см. рис. 11Д), C_{60}-NO_2-пролин-NO_2 (см. рис. 11Е)) показало, что C_{60}-NO_2-пролин-NO_2 оказывал эффективное антиамилоидное действия на амилоидные фибриллы исследуемых белка и пептида (Бобылев и др., 2010а). C_{60}-NO_2-пролин и C_{60}-$(NO_2)_2$-пролин разрушали амилоиды не так эффективно, как C_{60}-NO_2-пролин-NO_2, $C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$, NaFL и C_{60}/ПВП (Бобылев, 2011). Согласно ЭМ-наблюдениям, добавление C_{60}-аланина, C_{60}-NO_2-пролина и C_{60}-$(NO_2)_2$-пролина к амилоидным фибриллам Х-белка и Aβ(1-42)-пептида приводило к снижению их количества

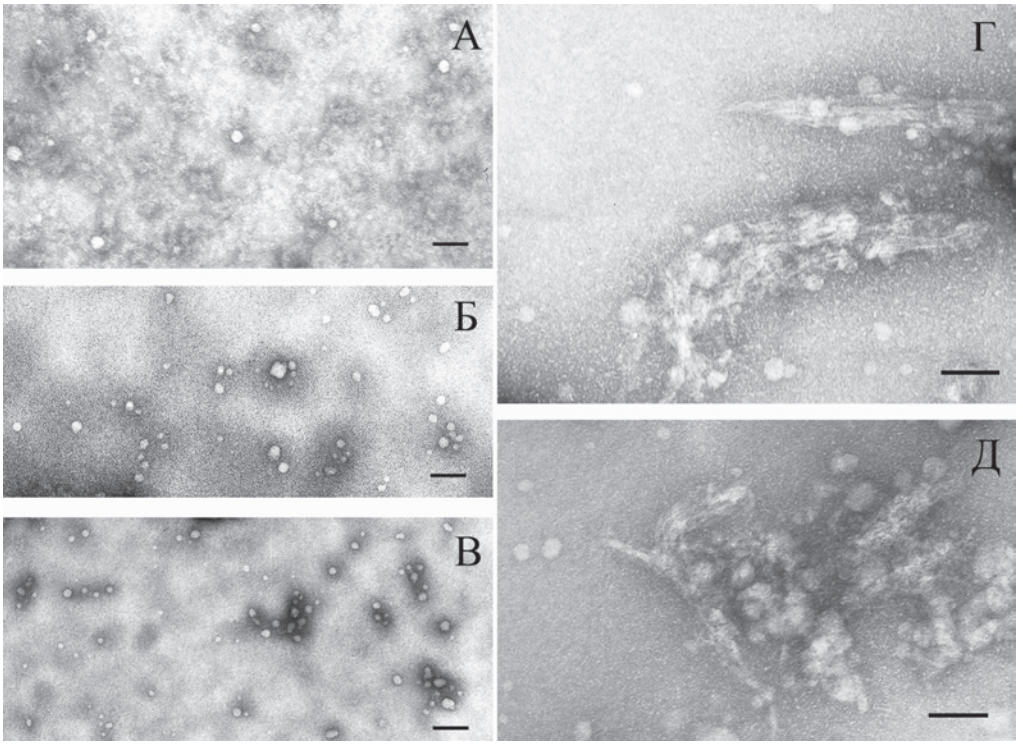


Рис 13. Электронные микрофотографии Х белка и Аβ(1-42)-пептида в присутствии и отсутствие C_{60}/ПВП

А – C_{60}/ПВП. Б – Х-белок в присутствии C_{60}/ПВП, добавленного до формирования амилоидных фибрилл. В – Х-белок в присутствии C_{60}/ПВП, добавленного после формирования амилоидных фибрилл. Весовое соотношение Х-белка и C_{60}/ПВП 1:1. Г – Аβ(1-42)-пептид в присутствии C_{60}/ПВП, добавленного до формирования амилоидных фибрилл. Д – Аβ(1-42)-пептид в присутствии C_{60}/ПВП, добавленного после формирования амилоидных фибрилл. Весовое соотношение Аβ(1-42)-пептида и C_{60}/ПВП 1:1. Инкубация 24 ч. Негативное окрашивание 2-процентным водным раствором уранилацетата. Шкала 100 нм

относительно контроля, а также к уменьшению их длины (рис. 14Б, Г). Зрелых фибрилл в данных образцах не наблюдалось. Также было обнаружено, что C_{60}-NO_2-пролин и C_{60}-$(NO_2)_2$-пролин в солевом растворе образуют агрегаты диаметром до 100 нм и более. Из полученных нами ЭМ-данных следует, что большинство исследованных производных фуллерена C_{60} и его комплексов разрушают амилоидные фибриллы мышечного Х-белка и Аβ(1-42)-пептида мозга. При этом действие одного и того же исследованного вещества на фибриллы белка и пептида сходно. Однако действие на амилоидные фибриллы исследуемого белка и пептида разных производных фуллерена C_{60}, по данным электронной микроскопии, не одинаковое. NaFL разрушает амилоидные фибриллы Х-белка и Аβ(1-42)-пептида более эффективно (см. рис. 12), чем, например, C_{60}-NO_2-пролин (см. рис. 14) при одной и той же концентрации.

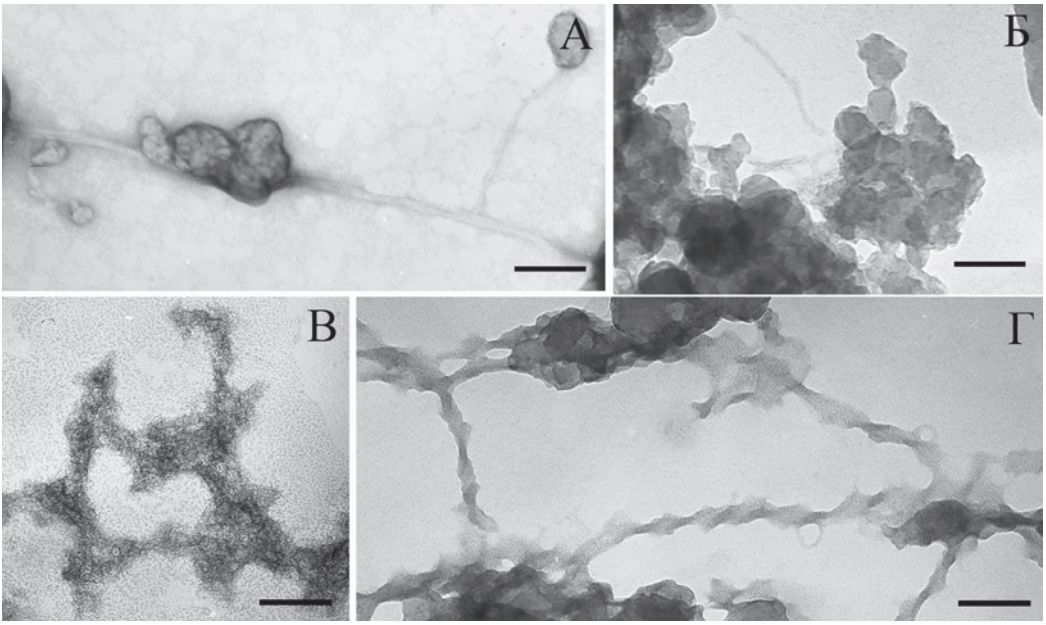


Рис 14. Электронные микрофотографии Аβ(1-42)-пептида и Х-белка в присутствии и отсутствие C_{60}-NO_2-пролина

А – Аβ(1-42)-пептид в присутствии C_{60}-NO_2-пролина, добавленного до формирования амилоидных фибрилл. Б – Аβ(1-42)-пептид в присутствии C_{60}-NO_2-пролина, добавленного после формирования амилоидных фибрилл. В – Х-белок в присутствии C_{60}-NO_2-пролина, добавленного до формирования амилоидных фибрилл. Г – Х-белок в присутствии C_{60}-NO_2-пролина, добавленного после формирования амилоидных фибрилл. Весовое соотношение Х-белка, Аβ(1-42)-пептида и C_{60}-NO_2-пролина 1:1. Инкубация 24 ч. Негативное окрашивание 2-процентным водным раствором уранилацетата. Шкала 100 нм

Таким образом, электронная микроскопия – многообещающий метод тестирования эффективности лекарственных препаратов для терапии болезни Альцгеймера.

Следующей нашей задачей было изучить антиамилоидные свойства исследованных веществ с помощью флуоресцентного анализа.

Ряд авторов, изучающих антиамилоидные свойства разных веществ, используют флуоресцентный анализ (Conway et al., 2001; Kim et al., 2005; Byeon et al., 2007; Reinke et al., 2007; Akaishi et al., 2008; Byun et al., 2008), в основе которого лежит свойство ТТ взаимодействовать с амилоидными фибриллами. При этом взаимодействии происходит увеличение интенсивности флуоресценции красителя при спектрофлуориметрических измерениях. Было показано, что причиной возрастания интенсивности флуоресценции ТТ при его связывании с амилоидными фибриллами является жесткость окружения, препятствующая повороту бензтиазольного и аминобензольного колец молекулы красителя друг относительно друга в возбужденном состоянии. Благодаря таким уникальным флуоресцентным свойствам ТТ широко используют при изучении амилоидогенеза *in vitro*.

При попытке исследовать антиамилоидный эффект C_{60} HyFn, C_{60}/ПВП, C_{60}-$(NO_2)_2$-пролин, C_{60}-NO_2-пролин и C_{60}-аланин на фибриллы мышечного Х-белка и

Aβ(1-42)-пептида мозга флуоресцентным методом мы обнаружили, что эти фуллерены способны поглощать свет в той же области, что и краситель ТТ, поэтому использование флуоресцентного анализа при оценке антиамилоидного эффекта для данных фуллеренов является невозможным (Бобылев, 2011). Для данных веществ электронная микроскопия использовалась как один из основных методов оценки их способности разрушать амилоидные фибриллы.

По данным флуоресцентного анализа натриевая соль поликарбоксильного производного фуллерена C_{60} разрушала амилоидные фибриллы Aβ(1-42)-пептида и Х-белка (рис. 15Б, Д) (Бобылев и др., 2010б). Разрушение амилоидных фибрилл Aβ(1-42)-пептида и Х-белка этим производным приводило к значительному снижению интенсивности флуоресценции ТТ. Aβ(1-42)-пептид и Х-белок в присутствии $C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$, добавленной до формирования ими амилоидных фибрилл, после 24 ч инкубации не увеличивали интенсивность флуоресценции тиофлавина Т. Это также свидетельствует о способности $C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$ предотвращать образование амилоидных фибрилл. Аналогичные данные были получены для NaFL, C_{60}-NO_2-пролин-NO_2 и C_{60}-аланина (рис. 15А, Г и 15В, Е) (Бобылев, 2011).

Таким образом, результаты, полученные с помощью флуоресцентного анализа, подтвердили электронно-микроскопические данные. ЭМ в комплексе с флуоресцентным анализом повышают объективность отбора наиболее эффективных антиамилоидных веществ.

Мы показали, что фуллерен C_{60} и его водорастворимые производные разрушают амилоидные фибриллы мышечного Х-белка. Нам необходимо было проверить, как исследованные вещества действуют на другие фибриллярные структуры мышц. Так как фибриллы актина являются одним из структурных элементов саркомера сократительного аппарата мышц, мы исследовали способность фуллерена C_{60} и его производных влиять на формирование фибрилл актина и взаимодействовать с ними *in vitro*.

Мышечный актин занимает второе место по количеству в саркомере после миозина, составляя 22% от общего количества саркомерных белков. Кроме того, фибриллярный актин является одним из основных компонентов цитоскелета эукариотических клеток. Это обуславливает интерес изучения его взаимодействия с фуллереном C_{60}. Актин является глобулярным белком с преобладанием в его в структуре α-спирали. Он способен формировать длинные нити. В мышечном саркомере их длина составляет ~1 мкм. Однако сформированные *in vitro* нити актина могут достигать нескольких микрометров.

С помощью ЭМ мы исследовали способность C_{60}/ПВП, NaFL, а также $C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$ разрушать нити актина, сформированные *in vitro*, или препятствовать их формированию (Бобылев и др., 2012а).

При исследовании способности C_{60}/ПВП (м.м. ПВП 10000 и 25000) и NaFL влиять на структуру нитей актина показано, что данные вещества не разрушали нити актина в течение 24 ч (рис. 16Б) (для NaFL данные не представлены). Показано также, что глобулярный актин в присутствии C_{60}/ПВП и NaFL способен строить нити (рис. 16В). Эти результаты свидетельствуют о специфическом взаимодействии данных фуллеренов с амилоидными фибриллами Х-белка и Aβ(1-42)-

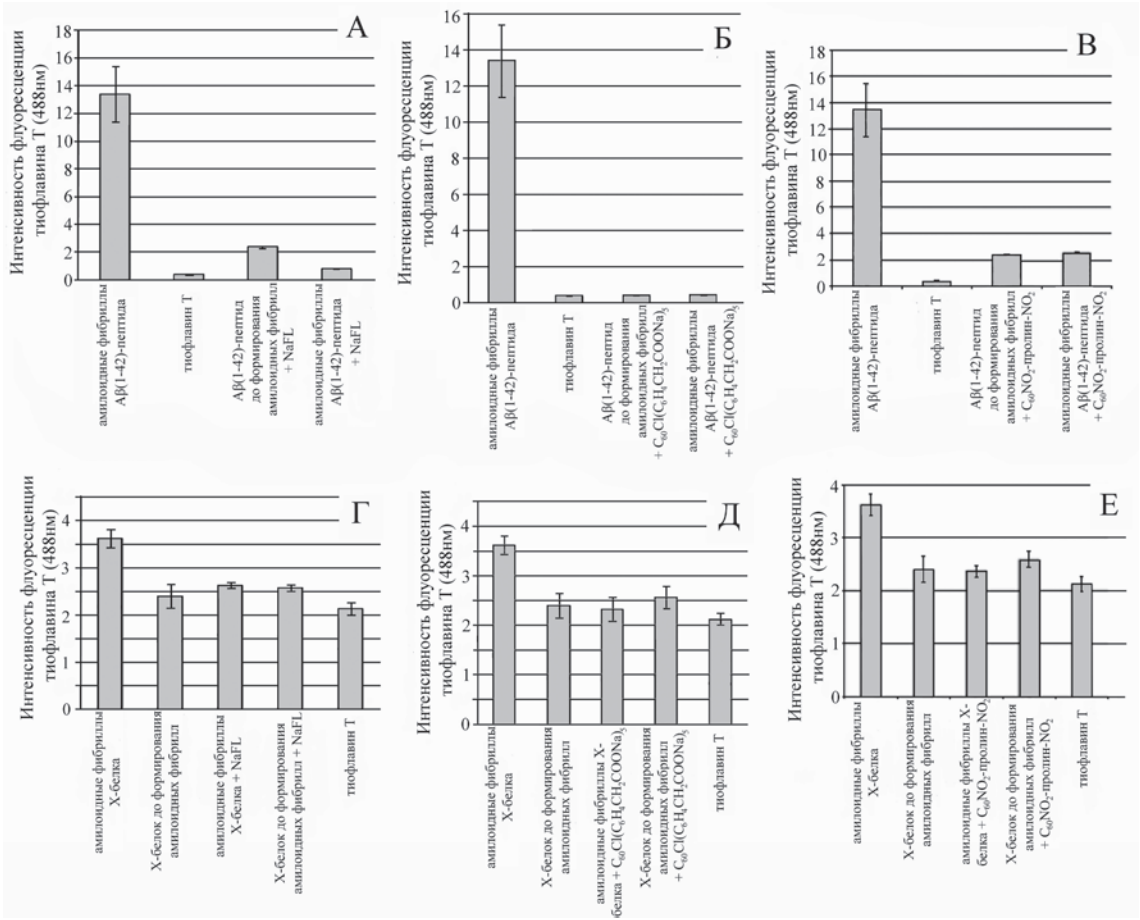


Рис. 15. Интенсивность флуоресценции тиофлавина Т

А, Б, В – в присутствии Аβ(1-42)-пептида и NaFL (А), $C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$ (Б), C_{60}-NO_2-пролин-NO_2 (В). Г, Д, Е – в присутствии Х-белка и NaFL (Г), $C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$ (Д), C_{60}-NO_2-пролин-NO_2 (Е)

пептида с последующим их разрушением, а не с фибриллами актина. Напротив, $C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$ разрушала нити актина, а также препятствовала их формированию (рис 16Г, Д).

Анализируя полученные ЭМ данные о влиянии исследованных производных фуллерена C_{60} на филаментообразование актина, можно заключить, что гидрофобные взаимодействия вносят основной вклад в способность фуллерена C_{60} связываться с патологическими для клетки амилоидными фибриллами и разрушать их, не нарушая структуры фибрилл актина. Однако результаты, полученные для $C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$, которая препятствовала формированию нитей актина и разрушала их, вызывают сомнения по поводу возможности ее применения на биологических объектах. Поэтому мы провели исследования токсичности использованных производных фуллерена C_{60} и его комплексов (Bobylev et al., 2011; Бобылев и др., 2012b).

В качестве объекта исследования токсического действия фуллерена C_{60} и его производных была выбрана культура клеток карциномы гортани человека HEp-2. Эта клеточная культура широко используется в качестве модели, так как она не требует сложных сред, обладает четким митотическим индексом и на вторые-третьи сутки образует монослой.

Мы показали, что C_{60}/ПВП (м.м. ПВП 25000 и 10000) не оказывали токсического действия на культуру клеток HEp-2 (рис. 17А). В этой культуре клеток наблюдалась их 100-процентная выживаемость при добавлении как комплексов C_{60} с поливинилпирролидоном, так и самого полимера ПВП с молекулярными массами 25000 и 10000 в диапазоне концентраций 0,016–2 мг/мл.

Исследование цитотоксичности NaFL, C_{60}-аланина и C_{60}-NO_2-пролина показало ее отсутствие на HEp-2 культуру клеток в диапозоне концентраций 0,016–2мг/мл для C_{60}-аланина (рис. 17В) и NaFL, а также 0,001–0,2 мг/мл для C_{60}-NO_2-пролина (рис. 17Б).

$C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$ оказывала выраженное токсическое действие на исследуемую культуру клеток в диапазоне концентраций 0,016–2 мг/мл (рис. 17Г), что наряду с данными по разрушающему действию на мышечный актин исключает ее из списка потенциальных антиамилоидных веществ.

Нам не удалось исследовать токсичность C_{60}-$(NO_2)_2$-пролина и C_{60}-NO_2-пролин-NO_2 на клеточной культуре. Это связано с их способностью образовывать крупные (до 200 нм и более) нерастворимые агрегаты (данные электронной микроскопии).

Анализируя имеющиеся экспериментальные данные, мы выделили наиболее эффективные и нетоксичные антиамилоидные вещества среди исследованных производных фуллерена C_{60}. В таблице представлены основные свойства, на наш взгляд, определяющие эффективность изучаемых веществ. Среди них основными являются антиамилоидный эффект, оказываемый фуллереном или его производными на амилоиды Х-белка и Aβ(1-42)-пептида, а также токсические свойства фуллеренов.

Из таблицы следует, что фуллеренолат натрия является наиболее эффективным и нетоксичным антиамилоидным веществом. Он не образует агрегатов, способен разрушать амилоиды и предотвращать их образование, нетоксичен, и его антиамилоидный эффект можно регистрировать по интенсивности флуоресценции ТТ.

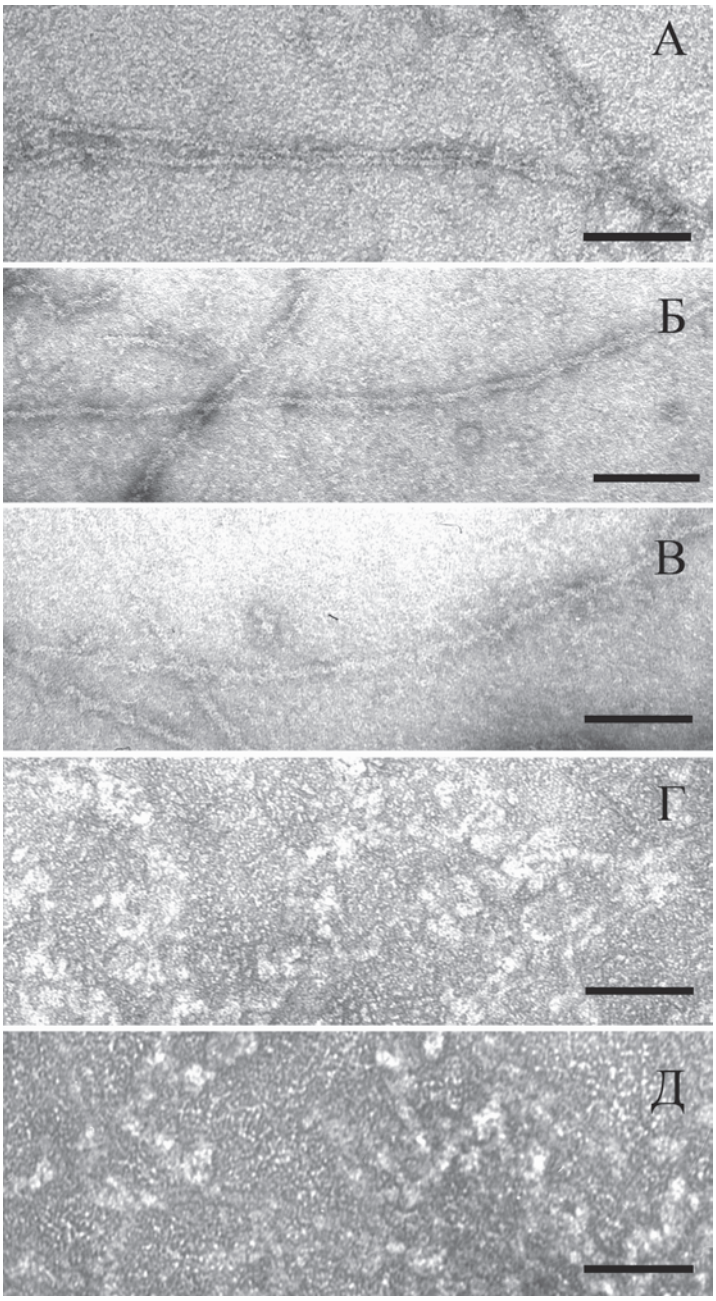


Рис. 16. Электронные микрофотографии актина в присутствии и отсутствие C_{60}/ПВП и $C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$

А – нити актина в 0,1М растворе KCl, pH 7,0. Б – нити актина в присутствии C_{60}/ПВП, добавленного до формирования нитей. В – актин в присутствии C_{60}/ПВП, добавленного после формирования нитей. Весовое соотношение актина и C_{60}/ПВП 1:1. Актин в присутствии $C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$, добавленной до (Г) и после (Д) образования филаментов. Весовое соотношение актина и $C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$ 1:1. Инкубация 24 ч. Негативное окрашивание 2-процентным водным раствором уранил-ацетата. Шкала 100 нм

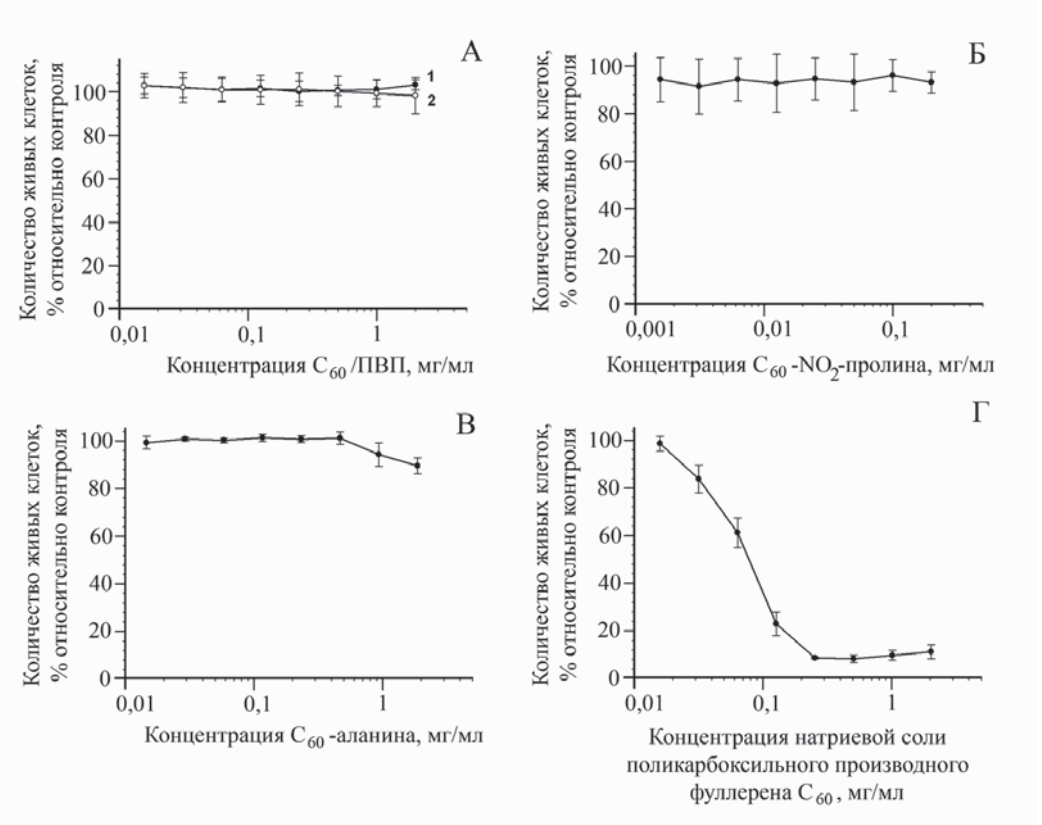


Рис. 17. Исследование цитотоксического действия исследованных фуллеренов

А – комплексы фуллерена C_{60} с поливинилпирролидоном (1 – C_{60}/$ПВП_{10000}$; 2 – C_{60}/$ПВП_{25000}$). Б – C_{60}-NO_2-пролин. В – C_{60}-аланин. Г – натриевая соль поликарбоксильного производного фуллерена C_{60}

Также в группу наиболее эффективных и нетоксичных антиамилоидных веществ можно отнести комплексы фуллерена C_{60} с ПВП, поскольку наряду с сильными антиамилоидными свойствами, низкой агрегационной способностью, у этих комплексов отсутствует токсичность. Мы также показали, что C_{60}/ПВП (м.м. ПВП 10000 и 25000) и фуллеренолат натрия не препятствуют филаментообразованию актина и не разрушают его нити *in vitro*.

Среди всех исследованных производных фуллерена C_{60} были отобраны фуллеренолат натрия и комплексы фуллерена C_{60} с ПВП как наиболее эффективные и нетоксичные антиамилоидные вещества, на основе которых могут быть созданы антиамилоидные препараты.

Таким образом, наши комплексные методические подходы, с одной стороны, дающие оценку антиамилоидных свойств разных препаратов как визуальным так и спектральным методами, а с другой – оценку цитотоксичности исследуемых антиамилоидных веществ, позволяют осуществлять подбор наиболее ценных и не-

Таблица 1

Сравнительная оценка эффективности антиамилоидных веществ

Фуллерен C_{60} или его производное	Антиамилоидный эффект на фибриллы мышечного Х-белка и Аβ(1-42)-пептида мозга	Токсичность	Способность агрегировать	Возможность исследования антиамилоидного эффекта флуоресцентным методом
Гидратированный фуллерен (C_{60} HyFn)	Разрушает зрелые фибриллы и предотвращает их формирование	На клетках токсичность не могла быть исследована [1]	Образуют сферические агрегаты ~10–110 нм	нет
Натриевая соль поликарбоксильного производного фуллерена C_{60} ($C_{60}Cl(C_6H_4CH_2COONa)_5$)	Разрушает амилоидные фибриллы и предотвращает их образование	Токсична на культуре клеток HEp-2 в диапазоне концентраций 2–0,16 мг/мл	нет	да
Фуллеренолат натрия (полигидроксилированное производное фуллерена C_{60} ($Na_4[C_{60}(OH)_{\sim 30}]$))	Разрушает амилоидные фибриллы и предотвращает их образование	Нетоксичен на культуре Hep-2 в диапазоне концентраций 2–0,16 мг/мл	нет	да
Комплексы фуллерена C_{60} с поливинилпирролидоном (м.м. ПВП 25000 и 10000)	Разрушают амилоидные фибриллы и предотвращают их образование	Нетоксичны на культуре Hep-2 в диапазоне концентраций 2–0,16 мг/мл	Образуют сферические агрегаты ~50–60 нм	нет
C_{60}-NO_2-пролин (метиловый эфир L-N-[(2-нитроглицерил) фуллеренил]пролина)	Снижает количество фибрилл и их длину относительно контроля	Нетоксичен на культуре Hep-2 в диапазоне концентраций 0,2–0,0016 мг/мл	Образуют агрегаты до 100 нм и более	нет
C_{60}-$(NO_2)_2$-пролин (метиловый эфир L-N-[(2,3-динитроглицерил) фуллеренил]пролин)	Снижает количество фибрилл и их длину относительно контроля	На клетках токсичность не могла быть исследована	Образуют агрегаты до 100 нм и более	нет
C_{60}-NO_2-пролин-NO_2 (2-нитроксиэтиловый эфир L-N-{[2-(нитрокси)этил] фуллеренил}пролина)	Разрушает амилоидные фибриллы и предотвращает их образование	На клетках токсичность не могла быть исследована	нет	да

C_{60}-аланин	Снижает количество фибрилл относительно контроля	Нетоксичны на культуре Нер-2 в диапазоне концентраций 2–0,16 мг/мл	нет	нет

[1] Есть данные том, что введение в мозг крысам фуллерена C_{60} HyFn положительно влияет на когнитивные процессы в норме (Podolsky et al., 2007). Это косвенное указание на отсутствие у него токсичности.

токсичных лекарственных средств для борьбы с разными амилоидами и амилоидозами. Эти подходы могут быть отработаны на системах саркомерных белков семейства тайтина, благодаря их свойствам, благоприятствующим проведению эффективных исследований.

Литература

Барсуков А., Шустов С., Шкодкин И. и др. Гипертрофическая кардиомиопатия и амилоидоз сердца // Врач. 2005. Вып. 10. С. 42-46.

Бобылёв А.Г. Сравнительное изучение амилоидных свойств мышечных белков и Aβ(1-42)-пептида мозга. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Пущино, 2011. 24 с.

Бобылёв А.Г., Марсагишвили Л.Г., Шпагина М.Д., Подлубная З.А. Амилоиды мышечного Х-белка семейства тайтина и Aβ-пептидов мозга: тестирование эффективности антиамилоидных препаратов // Технологии живых систем. 2009. Т. 6. № 7. С. 46-53.

Бобылёв А.Г., Марсагишвили Л.Г., Шпагина М.Д. и др. Действие нитропроизводных фуллерена C_{60} на фибриллы Aβ(1-42)-пептида мозга и мышечного Х-белка // Биофизика. 2010а. Т. 55. Вып. 3. С. 394-399.

Бобылёв А.Г., Марсагишвили Л.Г., Подлубная З.А. Флуоресцентный анализ действия водорастворимых производных фуллерена C_{60} на амилоидные фибриллы Aβ (1-42)-пептида мозга // Биофизика. 2010б. Т. 55. Вып. 5. С. 780-784.

Бобылёв А.Г., Шпагина М.Д., Бобылёва Л.Г. и др. Антиамилоидные свойства производных фуллерена C_{60} // Биофизика. 2012а. Т. 57. Вып. 3. С. 416-421.

Бобылёв А.Г., Окунева А.Д., Бобылёва Л.Г. и др. Изучение цитотоксичности производных фуллерена C_{60} // Биофизика. 2012б. Т. 57. Вып. 5. С. 746-750.

Бобылёва Л.Г., Бобылёв А.Г., Шпагина М.Д. и др. Изучение амилоидных свойств гладкомышечного белка смитина // Технологии живых систем. 2010. Т. 7. № 8. С. 64-68.

Вихлянцев И.М., Подлубная З.А. Структура и функции тайтина – гигантского белка скелетных и сердечных мышц: доказательства и предположения // Биофизика. 2007. Т. 52. Вып. 6. С. 1030-1040.

Макарова Е.Г., Кордонец О.Л., Муганцева Е.А. и др. Влияние C_{60} фуллерена на экспериментальных моделях болезни Альцгеймера *in vitro* и *in vivo* // Тез. докл. 3-его Международного Междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». Судак, Украина. 2007. С. 149-150.

Марсагишвили Л.Г. Изучение амилоидных свойств саркомерных белков семейства тайтина: Автореф. дисс. канд. биол. наук. Пущино, 2007. 24 с.

Марсагишвили Л.Г., Шпагина М.Д., Емельяненко В.И., Подлубная З.А. Саркомерные белки семейства тайтина образуют амилоиды // Биофизика. 2005. Т. 50. Вып. 5. С. 803-809.

Марсагишвили Л.Г., Шпагина М.Д., Подлубная З.А. Временная зависимость образования амилоидных фибрилл Х-белка // Медико-биологические аспекты действия физических факторов. Ред. В.С. Улащик. Минск, Беларусь: Бизнесофсет, 2006. С. 242-245.

Марсагишвили Л.Г., Шпагина М.Д., Подлубная З.А. Влияние фуллерена на формирование амилоидных фибрилл Х-белком // Тез. докл. XX Съезда Физиологического общества им И.П. Павлова. М., 2007. С. 326.

Марсагишвили Л.Г., Бобылев А.Г., Шпагина М.Д., и др. Влияние фуллеренов на амилоиды Х-белка // Биофизика. 2009. Т. 54. Вып. 2. С. 202-205.

Пиотровский Л.Б. Фуллерены в биологии и медицине: проблемы и перспективы // Фундаментальные направления молекулярной медицины. СПб.: Росток, 2005. С 195-268.

Пиотровский Л.Б., Киселев О.И. Фуллерены в биологии. СПб.: Росток, 2006. 336 с.

Подлубная З.А., Марсагишвили Л.Г. Роль мышечных цитоскелетных белков в патогенезе амилоидозов, в их диагностике и терапии // Вестник новых медицинских технологий. 2007. Т. XIV. № 4. С. 103-105.

Подлубная З.А., Марсагишвили Л.Г. Новые амилоидные белки семейства тайтина и их свойства: перспективы для диагностики амилоидозов // Технологии живых систем. 2008. Т. 5. № 5-6. С 11-21.

Подлубная З.А., Подольский И.Я., Шпагина М.Д., Марсагишвили Л.Г. Электронно-микроскопическое изучение влияния фуллерена на формирование амилоидных фибрилл Аβ(25-35) пептидом // Биофизика. 2006. Т. 51. № 5. С. 795-798.

Сидоров Л.Н., Болталина О.В. Эндоэдральные и экзоэдральные фторпроизводные фуллеренов // Успехи химии. 2002. Т. 71. С. 611-640.

Сторожаков Г.И., Гендлин Г.Е. Амилоидоз сердца // Сердечная недостаточность. 2000. Т. 1. № 1. С. 30-34.

Akaishi T., Morimoto T., Shibao M. et al. Structural requirements for the flavonoid fiserin in inhibiting fibril formation of amyloid beta protein // Neurosci. Lett. 2008. Vol. 444. P. 280-285.

Alekseeva Y.A., Emel'yanenko V.I., Petropavlov N.N. Shpagina M.D., Podlubnaya Z.A. Searching for proteins-precursors of amyloids among titin family proteins // Abstr. Intern. Symp. «Biological motility», Pushchino, Russia, 2004. P. 208-209.

Andrievsky G.V., Bruskov V.I., Tykhomyrov A.A., Gudkov S.V. Peculiarities of the antioxidant and radioprotective effects of hydrated C60 fullerene nanostrutures *in vitro* and *in vivo* // Free Radic. Biol. Med. 2009. Vol. 47. № 6. P. 786-793.

Beck M., Mandy G. Solubility of C_{60} // Full. Sci. Technol. 1997. Vol. 5. P. 291-310.

Bobylev A.G., Kornev A.B., Bobyleva L.G. et al. Fullerenolates: Metallated Polyhydroxylated Fullerenes with Potent Antiamyloid Activity // Organic & Biomolecular Chemistry. 2011. Vol. 9. P. 5714-5719.

Byeon S.R., Lee J.H., Sohn J.H. et al. Bis-styrylpyridine and bis-styrylbenzene derivatives as inhibitors for Abeta fibril formation // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2007. Vol. 17. P. 1466-1470.

Byun J.H., Kim H., Kim Y. et al. Aminostyrylbenzofuran derivatives as potent inhibitors for Abeta fibril formation // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008. Vol. 18. P. 5591-5593.

Chiang L.Y., Lu F.-J., Lin J.-T. Free radical scavenging activity of water-soluble fullerenols // J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1995. Vol. 12. P. 1283-1284.

Chiti F., Webster P., Taddei N. et al. Designing conditions for in vitro formation of protofilaments and fibrils // PNAS. 1999. Vol. 96. P. 3590-3594.

Conway K.A., Rochet J.C., Bieganski R.M., Lansbury P.T. Kinetic stabilization of the alpha-synuclein protofibril by a dopamine-alpha-synuclein adduct // Science. 2001. Vol. 294. P. 1346-1349.

Dugan L.L., Gabrielsen J.K., Yu S.P. et al. Buckminsterfullerenol free radical scavengers reduce excitotoxic and apoptotic death of cultured cortical neurons // Neurobiology of Disease. 1996. Vol. 3. P. 129-135.

Forloni G., Colombo L., Girola L. et al. Antiamyloidogenic activity of tetracyclines: studies in vitro // FEBS Lett. 2001. Vol. 487. P. 404-407.

Goldsbury C.S., Wirtz S., Müller S.A. et al. Studies on the in vitro assembly of Aβ(1-40): implications for the search for Aβ fibril formation inhibitors // J. Struct. Biol. 2000. Vol. 130. P. 217-231.

Gruden M.A., Davudova T.B., Malisauskas M. et al. Autoimmune responses to amyloid structures of Aβ(25-35) peptide and human lysozyme in the serum of patients with progressive Alzheimer's disease // Dement. Geriatr. Cong. Disord. 2004. Vol. 18. P. 165-171.

Kim K., Keller T.C. III Smitin, a novel smooth muscle titin-like protein, interacts with myosin filaments in vivo and in vitro // J. Cell Biol. 2002. Vol. 156. P. 101-111.

Kim J.E., Lee M. Fullerene inhibit β-amyloid peptide aggregation // BBRC. 2003. Vol. 303 P. 576–579.

Kim Y., Randolph T.W., Stevens F.J., Carpenter J.F. Kinetics and energetics of assembly, nucleation, and growth of aggregates and fibrils for an amyloidogenic protein // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. P. 27240-27246.

Kim H., Park B.S., Lee K.G et al. Effects of naturally occurring compounds on fibril formation and oxidative stress of beta-amyloid // J. Agric. Food Chem. 2005. Vol. 53. P. 8537-8541.

Klunk W.E., Pettegrew J.W., Abraham D.J. Quantitative evaluation of Congo red binding to amyloid-like proteins with beta-pleated sheet conformation // J. Histochem. Cytochem. 1989. Vol. 37. P. 1273-1281.

Krebs M.R., Bromley E.H., Donald A.M. The binding of thioflavine-T to amyloid fibrils lokalisation and implications // J. Struct. Biol. 2005. Vol. 149. P. 30-37.

LeVine III H. Thioflavine T interactions with amyloid β-sheet structures // Amyloid. 1995. Vol. 2. P. 1-6.

Marsagishvili L.G., Podlubnaya Z.A. Amyloidogenic properties of X-, C- and H-proteins of sarcomeric cytoskeleton // J. Muscle Res. & Cell Motil. 2005. Vol. 26. № 1. P. 78-79.

McEwen C.N., McKay R.G., Larsen B.S. C-60 as a radical sponge // J. Am. Chem. Soc. 1992. Vol. 114. P. 4412-44.

O'Nuallain B., Williams A.D., Westermark P., Wetzel R. Seeding specificity in amyloid growth induced by heterologous fibrils // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279. P. 17490-17499.

Podlubnaya Z.A., Shpagina M.D., Marsagishvili L.G. et al. Inhibitory effect of fullerene on Aβ(25-35) peptide fibrillization: electron microscopic study // Abstr. Intern. Symp. «Biological motility: basic research and practice». Pushchino, Russia, 2006. P. 155-156.

Podlubnaya Z.A., Podolski I. Ya., Marsagishvili L.G., Shpagina M.D. Effects of hydrated forms of C_{60} fullerene on amyloids of X-protein and Aβ-peptides // Book of 8-th Biennial International Workshop «Fullerenes and atomic clusters». St. Petersburg, Russia, 2007. P. 222.

Podolsky I.YA., Podlubnaya Z.A., Kosenko E.A. et al. Effects of Hydrated Forms of C_{60} Fullerene on Amyloid beta-peptide Fibrillization *in vitro* and Performance of the Cognitive Task // J. Nanosci. Nanotech. 2007. Vol. 7. № 4/5. P. 1479-1485.

Reinke A.A., Gestwicki J.E. Structure-activity relationships of amyloid beta-aggregation inhibitors based on curcumin: influence of linker length and flexibility // Chem. Biol. Drug. Des. 2007. Vol. 70. P. 206-215.

Ruoff R.S., Tse D.S., Malhotra M., Lorents D.C. Solubility of fullerene C_{60} in a variety of solvents // J. Phys. Chem. 1993. Vol. 97. P. 3379-3383.

Sivaraman N., Dhamodaran R., Kaliappan I. et. al. Solubility of C_{60} in organic solvents // J. Org. Chem. 1992. Vol. 57. P. 6077-6079.

Uversky V.N., Fink A.L. Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded // Biochim. Biophys. Acta. 2001. Vol. 1698. P. 131-153.

Потенциальная роль сфинголипидов в качестве биомаркеров болезни Альцгеймера

А.В. Алесенко, С.И. Гаврилова

Содержание

1. Введение
2. Метаболизм сфинголипидов
3. Участие сфинголипидов в амилоидогенезе
4. Исследование сфинголипидов на моделях БА у животных
5. Роль сфингомиелиназы в патогенезе болезни Альцгеймера
6. Сфингомиелины при БА
7. Механизм участия церамида в патогенезе БА
8. Сфингозин и сфингозин-1-фосфат при БА
9. Изменение содержания сульфатидов в структурах мозга при развитии БА
10. Исследование сфинголипидов в периферических жидкостях при БА
11. Сфинголипиды крови при БА

1. Введение

Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее частой причиной слабоумия, развивающегося у лиц пожилого и старческого возраста. По данным ВОЗ, к 2040 г. в мире этим заболеванием будет страдать более 100 млн человек. Несмотря на значительные усилия мирового сообщества до сих пор не установлен пусковой патогенетический механизм нейродегенеративного процесса, лежащего в основе БА. В последние два десятилетия для его расшифровки все большую актуальность приобретают сфинголипиды клеток мозга, участвующие в процессе и агрегации βА (β-амилоидного пептида) и в проведении нейротоксического сигнала, индуцируемого βА и провоспалительным цитокином ФНО-α, которые рассматриваются в качестве основных индукторов нейродегенерации альцгеймеровского типа (Selkoe, 1994; Mielke et al., 2010). Отложение βА и созревание сенильных бляшек вызывает множество молекулярных изменений различного рода, которые приводят к прогрессирующей дисфункции и смерти нервных клеток по типу апоптоза или некроза (Selkoe, 1994). Однако молекулярные механизмы этиологии и патогенеза БА остаются неизвестными.

Особое внимание привлекают сфинголипиды (Haughey et al., 2010), т.к. ряд из них участвует в процессинге и олигомеризации βА пептида и в нарушении синаптической функции при БА.

Сокращения: АХЭ – ацетилхолинэстераза; БА – Болезнь Альцгеймера; БЭ – бульбэктомия; СМЖ – спинномозговая жидкость; СФЗ-1-Ф – сфингозин-1-фосфат; ФХ – фосфатидилхолины; ЦНС – центральная нервная система; APP – предшественник β-амилоидного пептида; βА – β-амилоидный пептид; Cer – церамиды; DHCer – дигидроцерамиды; DHSM – дигидросфингомиелины; iNOS – индуцибльная NO синтаза; SM – сфингомиелины.

При исследовании сфинголипидного метаболизма в структурах мозга на животных моделях БА и в спинномозговой жидкости, в сыворотке и плазме крови пациентов с БА стало очевидно, что такие относительно простые сфинголипиды, как церамид, сфингозин, сфингозин-1-фосфат и гликозилцерамид играют решающую роль в нейрональной функции благодаря регулированию скорости роста, дифференцировке и смерти клеток центральной нервной системы (ЦНС) (Lee et al., 2004; Jana, Pahan, 2004, 2010; Jana et al., 2009). Активация сфингомиелиназы (SMase), приводящая к накоплению проапоптотического агента – церамида (Horres, Hannun, 2012), может рассматриваться в качестве нового патогенетического механизма БА, что может служить предпосылкой для терапии этого заболевания путем использования препаратов нового поколения, ингибирующих активность сфингомиелиназы (Han et al., 2002, 2011; Huang et al., 2004; Katsel et al., 2007; Kosicek et al, 2012; Mielke et al., 2010, 2011). В связи с этим чрезвычайно важным является исследование изменений спектра сфинголипидов в клетках мозга животных, у которых моделируется БА, и в крови пациентов, страдающих БА, в ходе развития заболевания и его лечения. Особое значение приобретает точный и информативный метод анализа липидного спектра, которым является масс-спектрометрия, позволяющая однозначно, быстро и большом количестве проб с минимальным объемом исследуемого материала дать характеристику сложного спектра разнообразных липидных компонентов биологического материала. Применение этого метода позволило установить, что сфинголипиды могут быть диагностическими маркерами ранней стадии БА, на которой еще возможна медикаментозная коррекция заболевания, а также их анализ в ходе лечения позволяет определить его эффективность (Mielke et al., 2010, 2011; He, 2010).

Перспективным является также поиск эффективных препаратов, участвующих в коррекции нарушений липидного спектра, которые зафиксированы в ходе этого заболевания.

2. Метаболизм сфинголипидов

Класс сфинголипидов представляет собой высокоактивные биологические соединения, которые служат не только компонентами мембраны, но и участвуют в регулировании клеточной пролиферации, дифференцировке, межклеточных взаимодействиях, миграции клеток, внеклеточной и внутриклеточной передаче сигналов и в гибели клеток (Merrill, 2002; Hannun et al., 2008; Pruett et al., 2008; Pettus et al., 2002; Buccoliero, Futerman, 2003; Mao, Obeid, 2008). Для каждой из этих функций существует свой подкласс сфинголипидов, но внутри каждого подкласса присутствие или отсутствие определенных двойных связей может оказывать существенное влияние на их функции (Hakomori, 2003; Bielawska et al., 1993).

Сфинголипидный метаболизм является чрезвычайно сложным процессом и включает сотни молекулярных видов и метаболических путей (Merrill, 2002).

В основе структуры всех сфинголипидов лежит алифатический аминоспирт сфингозин. В состав сфингозина входят заряженные группы, такие как этаноламин, серин или холин, которые через амидную связь связываются с ацильными

группами, с жирными кислотами. Церамиды являются простейшими сфинголипидами, состоящими из жирной кислоты, прикрепленной посредством амидной связи к сфингозину. Церамид является предшественником сфингомиелина, в составе которого фосфорилхолин или фосфоэтаноламин прикреплены к 1-гидроксигруппе церамида. Церамиды могут деацилироваться до сфингозина, который, в свою очередь, фосфорилируется, образуя сфингозин-1-фосфат. Гликосфинголипиды также являются производными церамида, к которому добавляется один или несколько сахарных остатков, присоединенных с помощью α-гликозидной связи к 1 гидроксилу.

Центральная нервная система содержит большое количество сфинголипидов, метаболиты которых выполняют не только структурную роль в мембранах, но и являются источниками вторичных посредников, которые осуществляют передачу многочисленных клеточных сигналов (Alessenko, 2006). Метаболизм сфинголипидов осуществляется посредством многочисленных ферментов.

Сфингомиелиназы гидролизуют сфингомиелин до церамида и фосфохолина (Gatt 1963; Horres, Hannun, 2012). Сфингомиелиназы характеризуются pH-оптимумом своей активности (кислая – aSMase, щелочная – alkSMase и нейтральная – nSMase), локализацией в клетке и зависимостью от ионов металлов. Кислая SMase является Zn^{2+}-зависимой и преимущественно локализуется в лизосомах (Gatt, 1963), хотя встречается и секретируемая форма (Spence et al., 1989). Структура щелочной SMase отличается от других типов сфингомиелиназ (она принадлежит семейству нуклеотид пирофосфатаз/фосфодиэстераз), но ее ферментативные свойства совпадают с другими ферментами, расщепляющими сфингомиелин до церамида (Nilsson, 1969). Особенно много кислой SMase в слизистой кишечника и желчи, где она расщепляет сфингомиелины, поступающие с пищей (Duan, 2006). Кислая сфингомиелиназа активно и в больших количествах экспрессируется в клетках мозга, равномерно на всем протяжении его развития. Недостаток этого фермента в лизосомах клеток мозга приводит к нейродегенеративному заболеванию – болезни Нимана–Пика.

Семейство нейтральных сфингомиелиназ, наивысшая активность которых проявляется при pH=7,4, представлено 3 видами, различающимися локализацией в клетке и зависимостью от ионов. nSMase1 является Mg^{2+}-зависимой с молекулярной массой в 47,5 кДа и локализуется в эндоплазматическом ретикулуме, а nSMase2 – в аппарате Гольджи (Hofmann et al., 2000; Horres, Hannun, 2012; Levy et al., 2006) и этот тип сфингомиелиназ может траслоцироваться в перинуклеарное пространство в ответ на антиоксидантное действие глутатиона, а в ответ на оксидативный стресс nSMase2 переходит на плазматичесую мембрану (Levy et al., 2006). nSMase3 можно обнаружить в аппарате Гольджи, эндоплазматическом ретикулуме и плазматической мембране (Krut et al., 2006). Так же как и кислая сфингомиелиназа, нейтральная изоформа фермента активно экспрессируется в клетках мозга, особенно его экспрессия активизируется при нейрональном развитии.

В настоящий момент твердо установлено, что nSMase2 имеет отношение к нейродегенеративным заболеваниям, таким как болезнь Альцгеймера, деменция при СПИДе, болезнь Хантингтона, рассеянный склероз, боковой амитрофический склероз (прогрессирующая мышечная атрофия), инсульты и др. В патогенезе этих

заболеваний имеются общие черты, такие как усиленный нейрональный апоптоз и оксидативный стресс (Mahfoud et al., 2002).

Церамид превращается в сфингомиелин путем переноса с помощью фосфатидилхолин трансферазы фосфохолиновой группы из фосфатидилхолина на церамид. Кроме участия церамида в синтезе сфингомиелина он может превращаться в сфингозин и жирные кислоты при действии церамидаз. Подобно сфингомиелиназам, церамидазы также различаются по pH-оптимуму их ферментативной активности и локализации в клеточном пространстве. Известно к настоящему времени 5 церамидаз (Mao et al., 2008). Кислая церамидаза локализована в лизосомальных компартментах, нейтральная церамидаза преимущественно находится в плазматической мембране, три щелочных церамидазы обнаружены в аппарате Гольджи и плазматической мембране.

Сфингозин превращается с помощью сфингозин киназы в антиапоптотический агент – сфингозин-1-фосфат (Maceyka et al., 2012).

Ганглиозиды представляют собой обширное семейство сфинголипидов, которые в большом количестве содержатся в мозге человека и животных. В состав ганглиозидов входят гликосфинголипиды, состоящие из церамидов и олигосахаридов и одной или более сиаловых кислот, прикрепленных к сахарной цепочке. В настоящий момент известно более 40 ганглиозидов, различающихся главным образом положением и числом остатков сиаловых кислот. Ганглиозиды – важные структурные элементы мембран нервных клеток и составляют приблизительно 6% от общего содержания липидов в клетках мозга (Seyfried, Yu, 1984).

К настоящему времени стало очевидно, что такие простые сфинголипиды, как церамид, сфингозин, сфингозин-1-фосфат и гликозилцерамид, играют решающую роль в нейрональной функции благодаря регулированию скорости роста, дифференцировки и смерти клеток ЦНС. Нарушение баланса содержания различных классов сфинголипидов приводит к нарушению нейрональной функции и апоптозу клеток мозга.

Все перечисленные классы сфинголипидов претерпевают значительные изменения в ходе развития болезни Альцгеймера и, как в настоящее время установлено, участвуют в патогенезе данного заболевания (Katsel et al., 2007; Mielke, Lyketsos, 2010).

Поскольку количество сфинголипидов может достигать нескольких тысяч, необходим метод анализа, который бы разделял все липиды в соответствии с типом сфингоидного основания, жирнокислотными остатками и типом гидрофобной головы. Жидкостная хроматография, сопряженная с тандемной масс-спектрометрией, является на сегодняшний день единственным методом, позволяющим исследовать все эти молекулы даже в небольших количествах (Merrill et al., 2005; Sullard et al., 2005).

3. Участие сфинголипидов в амилоидогенезе

БА отличается от других когнитивных патологий, вызывающих клиническую деменцию, накоплением в ткани мозга агрегатов βА, являющегося основным ком-

понентом так называемых сенильных бляшек. Последние являются одним из характерных морфологических признаков БА. βА с молекулярной массой в 4 кДа, впервые охарактеризованный в 1985 г. (Masters et al, 1985), образуется в результате протеолитического расщепления конститутивного трансмембранного белка – предшественника амилоидного пептида или βAPP под действием β- и γ-секретаз. Существует также альтернативный путь расщепления βAPP при участии α-секретазы, который не завершается образованием амилоидного пептида. В нормальных условиях этот процесс является основным путем превращения βAPP. Однако при развитии БА активность α-секретазы снижается, а скорость амилоидогенных процессов под действием β- и γ-секретаз повышается, что ведет к ускоренному образованию βА. βА обладает высоковыраженными фибриногенными свойствами и его олигомеры являются токсичными для нервных клеток, вызывая дегенерацию нейронов и нарушение синаптической передачи (Walsh et al., 2002).

Особое внимание уделяется изучению роли липидов в амилоидогенезе, который, как принято считать, играет ключевую роль в индукции и развитии БА (Masters et al., 1985). Первичной мишенью βА является плазматическая мембрана нейронов, а ее липидная компонента принимает непосредственное участие в реализации нейротоксичности βА.

У больных по сравнению с контрольной группой значительно снижено молярное отношение [холестерин]:[фосфолипиды], являющееся основной физиологической характеристикой текучести мембран, изменение которого может активировать процессинг βА из предшественника βА (APP) и приводить к повышению уровня βА в ткани мозга (Eckert et al., 2000). Снижение вязкости мембран определяется прежде всего изменением липидного состава, в частности сфинголипидов, которые являются одним из главных компонентов липидной фазы плазматических мембран нервных клеток. Именно снижение уровня сфингомиелина, вероятно, способствует отложению амилоида и образованию сенильных бляшек; такие изменения в составе мембран могут также влиять на активность ферментов процессинга APP (Soderberg et al., 1992, Vetrivel, Thinakaran, 2010).

Наиболее значимые конформационные переходы βА происходят в присутствии сфинголипидов. Было установлено биофизическими методами, что фосфолипиды и ганглиозиды способны взаимодействовать с βА и менять его конформацию, что может частично определять нейротоксичность βА (Agira et al., 2008; Choo-Smith, Surewicz, 1997; Yanagisava, 2007). Альцгеймеровский βА содержит мутационный домен, который специфически взаимодействует с галактозилцерамидом и сфингомиелином в мономолекулярных пленках (Mahfoud et al., 2002). В присутствии ганглиозидсодержащих везикул происходит ускоренное образование βА фибрилл. βА1-42, связанный с ганглиозидами, был обнаружен в мозге пациентов с БА на ранних стадиях развития заболевания (Yanagisava et al., 1995). Предполагается, что образование таких структур может служить предпосылкой для последующего образования βА бляшек (Mahfoud et al., 2002; Yanagisava et al., 1995). Обнаружение факторов, приводящих к комплексообразованию GM1/βA, может обозначить новый механизм патогенеза БА и также дать возможность разработать новую стратегию предупреждения и лечения этого заболевания.

В последнее время показано, что особую роль в агрегации βА играют специфические домены на плазматической мембране, называемые рафтами, участвующие в клеточной сигнализации (Fantini et al., 2002; Vetrivel, Thinakaran, 2010). Рафты обогащены гликосфинголипидами, холестерином, сфинголипидами и мембранными белками, принимающими участие в проведении внеклеточных сигналов (Fantini et al., 2002; Vetrivel, Thinakaran, 2010).

Известно, что предшественник βА (APP) транспортируется и протеолитически расщепляется секретазами α, β, γ, которые включены в холестерин-сфингомиелиновые домены и, следовательно, эти липиды и изменение их соотношения в рафтах может отражаться на транспорте и процессинге APP (Vetrivel, Thinakaran, 2010). Таким образом, липидный состав рафтов, включающий ганглиозиды, сфингомиелин, холестерин и церамиды, может строго контролировать процессинг APP и агрегацию βА.

Предполагается, что увеличение внемембранного холестерина, который накапливается в процессе старения, является фактором риска развития БА. Однако анализ содержания холестерина в десяти структурных областях мозга пациентов с БА продемонстрировал неоднозначную вариабельность, в то время как концентрация убихинона одназначно была выше нормы на 30–100% (Soderberg et al., 1992). Более того, у умерших больных было зафиксировано уменьшение содержания холестерина. Однако это может отражать терминальную стадию болезни, так как на начальном ее этапе довольно эффективными являются статины, снижающие уровень холестерина. Эти препараты рекомендованы также для профилактики БА (Shepardson et al., 2011).

По сравнению с холестерином содержание сфингомиелина было снижено в мозге пациентов с БА и установлено резкое накопление длинноцепочечных церамидов (Cutler et al., 2004; He et al., 2010).

4. Исследование сфинголипидов на моделях БА у животных

Моделирование БА у животных проводится, как правило, на грызунах: мышах, крысах, морских свинках. Наиболее распространенной является методика получения мутантных животных, геном которых несет мутантные гены APP, пресенилинов 1 и 2 и белка τ (Bornemann, Staufenbiel, 2007). Однако эти мутации не отражают полностью всех случаев болезни Альцгеймера. У мутантных мышей не наблюдается выраженной гибели нейронов. Кроме трансгенных мышей в последнее время появились трансгенные крысы, которые несут признаки болезни Альцгеймера (Benedikz et al., 2009).

Инъекционные модели основываются на введении животным нейротоксинов, вызывающих преимущественную гибель специфических популяций нейронов; также довольно популярны инъекционные модели, в которых используется интрацеребральное введение βА или его фрагментов (Stepanichev et al., 2005; Островская и др., 2008), а также в некоторых случаях провоспалительных цитокинов, например, фактора некроза опухоли [ФНО-α] (Alessenko et al., 2004).

Однако введение βА в мозг животным не приводит к образованию амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков, но тем не менее данные модели позволяют моделировать когнитивные нарушения на ранних этапах БА (Stepanichev et al., 2005). В инъекционных моделях используются преимущественно мыши и крысы (Островская и др., 2008; Benedikz et al., 2009; Stepanichev et al., 2005).

Некоторыми авторами используется модель спорадической формы БА. Нейродегенерация альцгеймеровского типа инициируется удалением обонятельных луковиц (бульбэктомия, БЭ), которые тесно связаны с деятельностью лимбических структур, участвующих в процессах обучения и памяти. Наиболее адекватно этот тип модели осуществляется на морских свинках, у которых аминокислотная последовательность βА аналогична таковой у человека (Нестерова и др., 2007). Однако на этой модели показано, что на начальных стадиях развития патологии наблюдается стимуляция истинного нейрогенеза в мозге БЭ животных, что противоречит данным о снижении нейрогенеза в стареющем мозге человека и животных (Нестерова и др., 2007).

Примером исследования сфинголипидов на мутантных животных, модулирующих болезнь Альцгеймера, может служить работа (Barrier et al., 2010), в которой определяли содержание церамидов, сфингомиелинов, сульфатидов и галактозилцерамидов в коре мозга APP[SL]PS1Ki мышей, экспрессирующей человеческий APP 751 со шведской и лондонской мутациями в комбинации с пресенилином-1. Было обнаружено значительное накопление церамидов в коре этих животных по сравнению с мышами дикого типа PS1Ki, в то время как другие сфинголипиды, кроме галактозилцерамида, не претерпевали заметных изменений.

Нами впервые было показано, что введение βА или ФНО-α в мозг крыс приводит к активации сфингомиелиназы и накоплению церамида. Этот процесс наиболее выражен в гиппокампе по сравнению с корой и мозжечком (Alessenko et al., 2004).

Хроническое повышение внутриклеточных церамидов может замедлять элонгацию аксонов и интернализацию фактора роста нервов (De Chaves et al., 2001). Церамиды в нервных клетках вовлечены в апоптотические программы (Alessenko, 2006; Obeid et al., 1993). Эти сигнальные молекулы способны стимулировать как протеинкиназную, так и фосфатазную сигнальные системы (Lee et al., 2003). βА и церамид расположены в пределах одних и тех же рафтов, которые являются структурными элементами мембраны, и содержат в своем составе необходимые сигнальные системы для индукции апоптоза. В βА-индуцированном апоптозе принимает участие 75-рецептор ФНО-α и FAS-лиганд, которые представляют собой семейство клеточных рецепторов, использующих сфингомиелин-церамидный путь для проведения сигнала апоптоза (Obeid et al., 1993).

Более того, βА и церамид вызывают митохондриальную дисфункцию и индуцируют окислительный стресс (Beal, 2005). Не только увеличение церамида в результате гидролиза сфингомиелина происходит в ответ на стрессовые сигналы и апоптоз, но и наблюдается повышение его синтеза в этих условиях. Таким образом, результаты, полученные в модельных экспериментах, позволяют предположить, что церамид играет существенную роль в патогенезе БА, механизм его действия можно представить в виде последовательности событий, при которых βА прежде

всего индуцирует окислительный стресс и гидролиз сфингомиелина до церамида, завершающегося апоптотической гибелью нейронов.

Высокое содержание ганглиозидов характерно в ткани мозга и их очень часто используют в качестве биомаркеров биохимических патологий нервной системы (Yanagisava, 2007). Известно, что ганглиозиды участвуют в начальной стадии агрегации βА (Agira et al., 2008; Mahfoud et al., 2002; Vetrivel et al., 2010; Yanagisava, 2007). Довольно подробно изучается метаболизм ганглиозидов на различных моделях БА с использованием трансгенных животных (Agira et al., 2010). В зависимости от вида модели наблюдается разнообразный ход изменений в содержании различных ганглиозидов в структурах мозга животных, что говорит об очень тонкой настройке механизма амилоидогенеза с участием ганглиозидов.

5. Роль сфингомиелиназы в патогенезе болезни Альцгеймера

Несмотря на многочисленные исследования механизм апоптотической гибели нейронов под действием βА до сих пор не установлен. Однако в экспериментах на клетках мозга получены прямые доказательства того, что в проявлении цитотоксичности βА определенную роль играет фермент обмена сфинголипидов – SMase (Chen et al., 2006; He et al., 2010; Jana, Pahan, 2004, 2010; Lee et al., 2004; Xuan et al., 2010; Yang, et al., 2004; Zeng et al., 2005).

На клетках первичных нейронов показано, что их обработка фибриллярным βА вызывает экспрессию nSMase и повышение содержания церамида (Jana et al., 2004). При блокировании этого фермента снижалась гибель клеток, что подтверждает необходимость nSMAse для проявления цитотоксичности фибриллярного βА (Jana, Pahan, 2004). Ингибирование nSMAse глутатионом также уменьшает гибель дендроцитов (Lee et al., 2004). Эти результаты подтверждаются и в исследовании токсического влияния пептида βA_{25-35} на глиальные и эндотелиальные клетки. Так же как и в первом случае, был обнаружен нейропротекторный эффект в результате добавления S-нитрозоглутатиона (Yang et al., 2004).

Однако необходимо отметить неоднозначность результатов, касающихся сфингомиелиназ, ответственных за гибель клеток, индуцированную βА. Например, при действии пептида βА на дендритные клетки мышей активируется кислая SMAse, а ее инактивация обеспечивает устойчивость этих клеток к апоптозу при действии βА (Xuan et al., 2010). В противоположность этому, растворимый олигомер βА вызывает активацию как нейтральной, так и кислой SMase. Специфическое ингибирование фермента и нокдаун каждого из них обеспечивает резистентность клеток к βА-индуцированному апоптозу (Malaplate-Armand et al., 2006). Эти данные позволяют предположить участие обеих типов SMase в реализации апоптоза нервных клеток, индуцированных βА. Нами было показано, что введение βА или фактора некроза опухоли – α(ФНО-α) в мозг крыс приводит к активации нейтральной SMAse. Этот процесс наиболее выражен в гиппокампе по сравнению с корой и мозжечком (Alessenko et al., 2004). Однако в мозге умерших пациентов, страдавших БА, обнаружена активация только кислой SMAse (He et al., 2010). При анализе экспрессии генов, ответственных за синтез кислой SMAse и нейтральной SMAse 2,

было показано, что их активность резко повышается в мозге пациентов как с БА, так и с другими нейропатологиями (Fillipov et al., 2012).

Поскольку активация SMase изучалась на различных клеточных линиях, при действии разных форм βА, в экспериментах на животных и в постсмертных препаратах мозга человека, неудивительно, что одназначных результатов не получено. До сих пор нет трансгенной модели животных, которая бы полностью имитировала патофизиологический процесс БА, все еще неясно, какой тип βА является ответсвенным за клеточную гибель и потерю когнитивной способности у человека. Хотя локальная концентрация фибриллярного βА-пептида, присутствующего в мозге пациентов с БА, может отличаться от концентрации βА в первичных нейронах, используемых в экспериментах, тем не менее данные, свидетельствующие о связи между активацией сфингомиелиназы, накоплением церамида и последующей гибелью нейронов и олигодендроцитов, указывают на то, что сфингомиелиназа может быть терапевтической мишенью для лекарств, предупреждающих нейродегенеративные нарушения, вызванные БА.

6. Сфингомиелины при БА

По сравнению с церамидом изучение уровня сфингомиелина в структурах мозга пациентов с БА проводятся менее активно. Разными исследователями получены совершенно противоположные результаты. В работах (Bandaru et al., 2009; Chan et al., 2012; Pettegrew et al., 2001) найдено, что уровень сфингомиелина повышается, а Р.Г. Калтер и Кс. Хи показали его снижение при БА (Culter et al., 2004; He et al., 2010). Однако имеются также данные, что на всех стадиях заболевания не происходит изменений в содержаниии сфингомиелина в мозге пациентов с БА (Han et al., 2002).

До сих пор неизвестно, с чем связаны такие различия: с исследованиями, проводимыми на разных стадиях заболевания, либо с разными структурами мозга, где определяли содержание сфингомиелина.

7. Механизм участия церамида в патогенезе БА

Различные факторы, такие как цитокины, факторы роста, гормоны, окислительный стресс и радиация активируют SMase в различных тканях, приводя к накоплению церамида в них (Hannun et al., 2008). Гораздо меньше известно о механизмах, ответственных за активацию SMase в нейронах и в активированных глиальных клетках, приводящих к значительным повышениям уровня церамида. Знание механизма активации глиальных клеток чрезвычайно важно, поскольку с этим процессом связана потеря нейронов при развитии ряда нейродегенеративных заболеваний, включая БА. В экспериментах, в которых использовались астроциты – главные представители глиальных клеток, активированные 1мкМ βА (1-42) в комбинации с 10 нг/мл IL-1, изучался механизм их токсического действия на пер-

вичные нейроны человека (Jana et al., 2009; Jana et al., 2010). Было показаны резкая активация нейтральной SMSe и накопление церамида в нейронах в процессе их гибели, индуцированной активацией астроглии. Активация нейтральной SMSe в нейронах определяется NO, генерируемым активированной астроглией. В тоже время установлено, что в активированных астроцитах нейтральная SMSe способна индуцировать экспрессию мРНК индуцибльной NO синтазы (iNOS). Также было установлено, что экспрессия провоспалительных цитокинов TNF-α, IL-1, IL-6 в активированной астроглии зависит от нейральной SMSe. Участие βА в генерации церамида подтверждается тем, что только пептид A_{1-42}, но не его реверсионная форма ($βA_{42-1}$) индуцирует активацию SMase и генерацию церамида в нейронах (Jana et al., 2007). Кроме того именно фибриллярная форма пептида по сравнению с растворимой была наиболее эффективна в генерации церамида (Jana et al., 2004). βА индуцирует апоптоз также и в олигодендроцитах. При этом также как и в нейронах наблюдается повышение уровня церамидов (Lee et al., 2004) , активации каспазы -8 и фрагментация ДНК (Xuan et al., 2010). Добавление в клеточную культуру олигодендроцитов церамида или бактериальной SMase, повышающей содержание церамида, приводит их к гибели (Lee et al., 2004; Xuan et al., 2010). Более того ингибитор сфингомиелиназ (3-метил-сфингомиелин) эффективно защищают олигодендроциты от действия βА (Lee et al., 2004).

Чрезвычайно важна роль экспрессии iNOS при токсическом действии βА на клетки мозга. Механизм активации сигнальной системы NO и развития окислительного стресса при действии βА в клетках ЦНС показан на примере олигодентроцитов (Zeng et al., 2005). Этот процесс сопровождается активацией метаболического пути, в который вовлечена нейтральная SMase и в результате которого накапливается церамид (Shupik et al., 2011). Однако показано, что и церамид, и βА в этих клетках самостоятельно не вызывают экспрессию iNOS. Необходимо накопление TNF-α, который и индуцирует этот процесс, в то время как βА способен активировать только нейтральную SMase. Этот факт важен для понимания механизма развития БА, в патогенезе которой провоспалительная составляющая играет важную роль (Zeng et al.,2005).

Фактор роста нервов вызывает повышение уровня церамида в клетках глиомы Т9 и гиппокампальных нейронах в результате активации нейтральной SMase (De Chaves et al., 2001). В некоторых случаях, связанных со стресс-активированными сигналами, происходит активация кислой SMase в нейронах гиппокампа (Yu et al., 2000). Поскольку различные SMase локализованы в клетках в различных компартментах, то это означает, что на разного типа стимулы генерируются разные пулы церамидов (Obeid et al., 1993). Особое значение имеет для развития апоптоза, индуцируемого βА, пул церамидов, локализованных в митохондриях (Obeid et al., 1993).

В экспериментах на животных показано, что микроинъекция $βA_{1-42}$ в кору мышей линии C57/BL6 вызывает 3-х кратное накопление церамида в коре, которое индуцируется нейтральной SMase, в то время как активность кислой SMase в этих условиях не меняется (Jana, et al., 2010). βА, введенный в мозг крыс, способствует накоплению церамида преимущественно в гиппокампе (Alessenko et al., 2004).

Это находит подтверждение в повышенном уровне церамидов в мозге и спинномозговой жидкости пациентов с БА по сравнению с другими неврологическими патологиями, причем церамид накапливается в мозге пациентов уже на ранних стадиях заболевания (Gottfries et al., 1996; Han et al., 2002; Zhang et al., 1999). По другим данным, уровень церамида снижен в белом веществе средней фронтальной мозговой извилины у пациентов с БА по сравнению с контролем (Han et al., 2002). Эти различия, по-видимому, определяются стадией заболевания, поскольку в исследовании (Han et al., 2002) показано, что на ранней стадии деменции уровень церамида повышен, в то время как на поздней стадии отмечено понижение содержания церамида в структурах мозга.

При анализе 6 молекулярных видов церамида, которые отличаются по длине их жирных кислот, в мозге пациентов с БА и другими нейропатологиями было обнаружено повышение уровня Cer16 (церамида 16), Cer18, Cer20 и Cer24 при всех нарушениях функций мозга. При комбинации БА с другими патологиями уровень церамида оказывается самым высоким. Наиболее определенные результаты были получены при изучении экспрессии генов, которые контролируют синтез, метаболизм и деградацию церамида в процессе развития БА. Наблюдается разнонаправленная активация генов, отвечающих за содержание церамида в структурах мозга при специфических формах заболевания по сравнению с контролем (Katsel et al., 2007). Четко установлено, что синтез ферментов, контролирующих синтез церамида (Katsel et al., 2007), в особенности церамидов, содержащих длинноцепочечны жирные кислоты C22:0 и C24:0, был активирован на ранней стадии заболевания, в то время как синтез глюкозилцерамида, напротив, был снижен. То есть уровень разных типов церамидов может меняться зеркально на разных стадиях заболевания.

В ряде исследований отмечено, что сигнальная система сфингомиелинового цикла связана с окислительным стрессом (Alessenko, 2006; Shupik et al., 2011). Установлено, что активные формы кислорода непосредственно влияют на сфингомиелиназу либо на другие ферменты, которые, в свою очередь, регулируют активность сфингомиелиназы. Это может приводить к усилению токсического действия на клетки мозга цитокинов и βА в результате их совместного действия. Следует отметить, что природный антиоксидант глутатион ингибирует активность SMase. Снижение уровня глутатиона приводит к активации фермента и накоплению церамида в олигодендрацитах, вызывая их гибель (Lee et al., 2004). В клинической практике довольно успешно применяется антиоксидантная терапия, что подтверждает эффективность ингибирования процессов, связанных с активацией окислительных систем при развитии БА. Однако до сих пор не установлено, происходит ли ингибирование и сфингомиелинового каскада в этих условиях.

Таким образом, индукция сфингомиелинового цикла, приводящая к накоплению проапоптотического агента – церамида, может рассматриваться в качестве нового механизма БА, что может служить предпосылкой для терапии этого заболевания путем использования препаратов нового поколения, ингибирующих активность сфингомиелиназы (Arenz, 2010; Kornburger et al., 2010; Taguchi et al., 2003).

8. Сфингозин и сфингозин-1-фосфат при БА

Сфингозин, который обладает свойствами проапоптотического агента, накапливается в мозге умерших пациентов с БА по сравнению с нормальным контролем (He et al., 2010). Повышена и активность кислой церамидазы, превращающей церамид в сфингозин (He et al., 2010; Huang et al., 2004; Park, Schuchman, 2006). Однако до сих пор не известно, накапливается ли сфингозин или активируется фермент, генерирующий его из церамида, на ранней стадии заболевания. Следовательно, не известна роль сфингозина в патогенезе БА.

Сфингозин-1-фосфат (СФЗ-1-Ф) – фосфорилированный продукт сфингозина, в противоположность церамиду и сфингозину, обладает антиапоптотическими свойствами и участвует в регуляции клеточной пролиферации (Maceyka et al., 2012). Существуют единичные данные, указывающие, что уровень СФЗ-1-Ф уменьшается в цитозольной фракции серого вещества лобно-височной области мозга при БА по сравнению с контролем (He et al., 2010). Уровень СФЗ-1-Ф также негативно коррелирует с уровнем βA и фосфорилированным tau-белком в той же области мозга (He et al., 2010).

9. Изменение содержания сульфатидов в структурах мозга при развитии БА

Сульфатиды цереброзидов в большом количестве содержатся в мозге и представляют собой галактозил-3-сульфаты цереброзидов. Предшественником сульфатидов является галактозилцерамид. Имеются единичные исследования об изменении уровня галактозилцерамида в мозгу пациентов с болезнью БА. При БА его содержание увеличивается в средней фронтальной извилине (middle frontal gyrus) по сравнению с контролем, в то время как в мозжечке остается неизменным (Culter et al., 2004). Не было найдено различий в содержании галактозилцерамида и сульфатидов в липидах рафтов, выделенных из фронтальной коры мозга БА по сравнению с контролем. Эти данные указывают, что в различных структурах мозга при развитии БА происходят специфические изменения галактозилцерамида и сульфатидов. Более того, отмечено, что эти различия проявляются в зависимости от стадии заболевания. Уровень сульфатидов резко снижается на ранней стадии БА, а затем остается неизменным вплоть до терминальной стадии (Bandaru et al., 2009; Han et al., 2002, 2003).

Авторы этих исследований предполагают, что изменения в концентрации сульфатидов в определенных областях мозга отражают изменения в содержании амилоидных бляшек, которое резко увеличивается на начальной стадии болезни, однако их количественный рост замедляется на средней и поздней стадии деменции.

10. Исследование сфинголипидов в периферических жидкостях при БА

Спинномозговая жидкость (СМЖ) наиболее адекватно может отражать патологические изменения в мозге, вызванные БА. Как правило, у пациентов с БА изуча-

ют нарушения в липидном спектре мозга только на терминальной стадии, исследования же липидов СМЖ позволяют проследить за развитием заболевания, а также за эффективностью его лечения.

Оптимистичные результаты по диагностике начальной стадии БА получены при исследовании сульфатидов и отношения сульфатида/фосфатидилинозита Han et al., 2003). Были обнаружены вполне достоверные различия в отношении сульфатида/фосфатидилинозита между контролем и начальной стадией деменции альцгеймеровского типа, в то время как различий между контролем и начальной стадией БА в содержании βA_{1-42}, tau и p-tau231 в СМЖ обнаружено не было. Поэтому сульфатиды, очевидно, могут быть боле достоверным маркером для диагностики ранней стадии БА (Han et al., 2003).

Анализ содержания церамидов в СМЖ пациентов с разнообразными неврологическими заболеваниями (цервикальный спондилез, боковой амиотрофический склероз, метаболическая энцефалопатия, инсульт) показал, что при БА его содержание значительно выше, чем при этих патологиях и в контроле (Satoi et al., 2005). Наиболее высокое содержание церамида было обнаружено при средней тяжести заболевания по сравнению с начальной и тяжелой (Mielke et al., 2011).

Однако не изучались корреляции между изменением содержания в СМЖ церамидов и βA, tau и p-tau231, что позволило бы определить более конкретную роль церамидов в патогенезе БА.

Тем не менее, в литературе обсуждается возможность использования церамидов в качестве маркеров БА (Kosicek et al., 2012; Mielke et al., 2010, 2011). Некоторым ограничением может служить неспецифичность этого параметра для БА, поскольку уровень церамидов в СМЖ меняется и при других нейропатологиях. Однако церамиды можно использовать в качестве маркеров стадии развития заболевания. До сих пор для диагностики патологии мозга используются только когнитивные и поведенческие симптомы, но они проявляются уже на далеко зашедших стадиях нарушений функций мозга. Изменения же в церамидах могут сигнализировать о ранних нарушениях при БА, которые, возможно, будут доступны для медикаментозной коррекции (Mielke et al., 2011).

При анализе сфингомиелинов методом масс-спектрометрии было установлено, что их уровень повышается на ранней стадии заболевания, в то время как между средней и тяжелой стадиями заболевания практически нет различий. Эти данные подтверждают, что нарушения в метаболизме сфинголипидов могут служить диагностическим маркером риска развития БА (Mielke et al., 2011; Kosicek et al., 2012).

11. Сфинголипиды крови при БА

При анализе предполагаемых биомаркеров, определяемых в плазме крови при различных нейропатологиях, возникает вопрос, существует ли прямая корреляция между их измерениями в крови и патологическими процессами, осуществляющимися в мозге. Поэтому необходимо установить закономерность изменения уровня сфинголипидов в плазме крови в процессе развития БА.

Обнаружено, что содержание церамидов в крови понижено на ранней стадии БА, в то время как в мозге и спинномозговой жидкости – повышено (Kosicek et al., 2012; Mielke et al., 2011). Эти изменения коррелировали с нарушением когнитивных функций у пациентов. Однако таких исследований до сих пор выполнено не достаточно, чтобы использовать содержание церамидов крови для ранней диагностики БА. Необходимо также дальнейшее изучение корреляций между содержанием церамидов в плазме крови и спинномозговой жидкости на всем протяжении БА. Некоторые исследователи предполагают, что определение корреляции между изменениями сфинголипидов в крови и в СМЖ у пациентов с БА, и особенно на ранней стадии заболевания, позволят использовать сфинголипиды в качестве биомаркеров БА и, возможно, в качестве мишеней для лекарственных средств нового поколения (Kosicek et al., 2012; Mielke et al., 2010; Mielke, Lyketsos, 2010).

В последнее время интенсивно изучается связь между изменениями в спектре сфинголипидов в плазме крови пациентов с БА и нарастанием когнитивного дефицита для предсказания скорости развития деменции на основании результатов анализа сфинголипидов (Kosicek et al., 2012; Mielke et al., 2010; Mielke, Lyketsos, 2010).

Эта задача может быть решена благодаря развитию метода масс-спектрометрии и его успешному применению в липидологии.

В работах М.М. Милке и соавторами (Mielke et al., 2010, 2011) содержание церамидов (Cer), дигидроцерамидов (DHCer), сфингомиелинов (SM) и дигидросфингомиелинов (DHSM) было изучено методом хромато-масс-спектрометрии на 120 пациентах с деменцией альцгеймеровского типа и деменциями, связанными с другими нейропатологиями. Во всех случаях на протяжении более двух лет наблюдений обнаружено повышение Cer и DHCer, связанное с развитием деменции. В противоположность этому, у пациентов, в плазме которых наблюдался повышенный уровень SM и DHSM, а также отношения SM/Cer и DHSM/DHCer, развитие деменции происходило более медленно. В этой же работе показано, что изменения в уровне холестерина и триглицеридов не связано со скоростью развития деменции. Эти результаты позволяют предположить, что повышение отношения SM/Cer и DHSM/DHCer в плазме крови пациентов может служить маркером для предсказания скорости развития БА.

Аналогичные данные получены в работе (Han et al., 2011) при анализе липидов плазмы крови методом масс-спектрометрии у 26 пациентов с БА и 26 пожилых людей с нормальными когнитивными функциями. Из 33 сфингомиелинов 8 молекулярных видов, содержащих жирнокислотные алифатические цепи из 22 и 24 атомов углерода, были значительно ниже у пациентов с БА по сравнению с контролем. Уровень 2 молекулярных видов церамидов (16:0 и 21:0), напротив, был значительно выше в плазме крови с БА остальные 5 церамидов повышались незначительно. Отношение церамидов к сфингомиелинам, содержащим идентичные жирные кислоты, у пациентов с БА резко отличалось от контроля. Эти изменения отражали как нарушения в когнитивных функциях пациентов, так и в генотипе (при диагнозе определяли наличие генотипа по аполипопротеину Е4).

Кроме возможности использования сфинголипидов для тестирования развития БА они были бы полезны для мониторинга эффективности лечения каждого ин-

дивидуального пациента определенным лекарственным средством. Это особенно важно, если пациент получает новые лекарства или новые лекарства исследуются на предклинической или ранней клинической стадии.

Влияние прокогнетивных препаратов на содержание и спектр молекулярных видов сфигномиелинов и фосфатидилхолинов в плазме крови пациентов в процессе лечения БА. В настоящее время в клинической практике наиболее широко применяемыми препаратами для лечения БА являются мемантин (фирмы Merz) и ривастигмин (фирмы Novartis). Ривастигмин – ингибитор ацетилхолинэстеразы (АХЭ) (КФ 3.1.1.7) – фермента, функция которого нарушена при БА, а мемантин – ингибитор NMDA рецепторов глутаматергической системы, функция которой также нарушается в ходе развития этого заболевания (Гаврилова, 2007). Однако влияние этих препаратов на липидный метаболизм и возможность коррекции его нарушений в процессе лечения до сих пор не изучались.

Нами впервые было исследовано влияние ривастигмина и мемантина на содержание и молекулярный спектр фосфолипидов, которые в своем составе содержат холиновую группировку (сфингомиелины, фосфатидилхолины, лизофосфатидилхолины) (Каратассо и др., 2008). Нарушения в метаболизме этих фосфолипидов могут влиять на холинергическую систему за счет изменения баланса холина и лиганд-рецепторного взаимодействия, определяемого структурированностью мембран клеток нервной системы. Используя метод хромато-масс-спектрометрии, мы определили, какие именно молекулярные виды холинсодержащих фосфолипидов (различия молекулярных видов фосфолипидов определяются набором жирных кислот, входящих в их состав) особенно активно подвергаются действию изучаемых ингибиторов (Каратассо и др., 2008).

Ривастигмин, блокируя действие АХЭ и БуХЭ, способствует повышению биодоступности нейромедиатора ацетилхолина. Он зарегистрирован для лечения БА на этапе мягкой и умеренной деменции. Мемантин, нормализуя мембранный потенциал, активирует процесс передачи нервного импульса в глутаматэргической системе, что приводит к улучшению когнитивных процессов, памяти и способности к обучению, повышает повседневную активность пациентов (Гаврилова, 2007). Перечисленные выше свойства мемантина указывают на его возможную способность оказывать модулирующее действие на компоненты мембран клеток головного мозга, в том числе и на липидные структуры.

Исследование фосфолипидных спектров методом масс-спектрометрии плазмы крови пациентов с БА на стадии умеренной деменции до и после лечения ривастигмином и мемантином по истечении 3 и 6 месяцев соответственно с начала курса терапии показало, что препараты снижают уровень всех изученных фосфолипидов в плазме крови (Каратассо и др., 2008).

При детектировании по молекулярным массам отдельных типов фосфолипидов была обнаружена избирательность действия этих препаратов на определенные молекулярные виды тех или иных фосфолипидов. Было установлено дифференцированное влияние ривастигмина и мемантина на фосфатидилхолины (ФХ) с различным набором жирных кислот.

Наиболее четкие изменения при действии ривастигмина, выраженные в уменьшении содержания, зафиксированы для ФХ с набором жирных кислот 16:0/18:2, 18:1/20:2 и 18:0/20:4, соответствующих молекулярным массам 758,6, 808,6 и 810,6. При действии мемантина наибольшие изменения происходили во фракции ФХ с жирными кислотами 16:0/18:2, 18:0/18:2, 18:0/20:4 (рис. 1). Также в ходе лечения уменьшается уровень всех лизофосфатидилхолинов (рис. 2). Сфингомиелины с жирными кислотами 16:1, 16:0, 18:3 и 18:0 проявляют тенденцию к снижению. Наибольшие изменения зафиксированы для СМ 16:0 с молекулярной массой 703,6 (рис. 3).

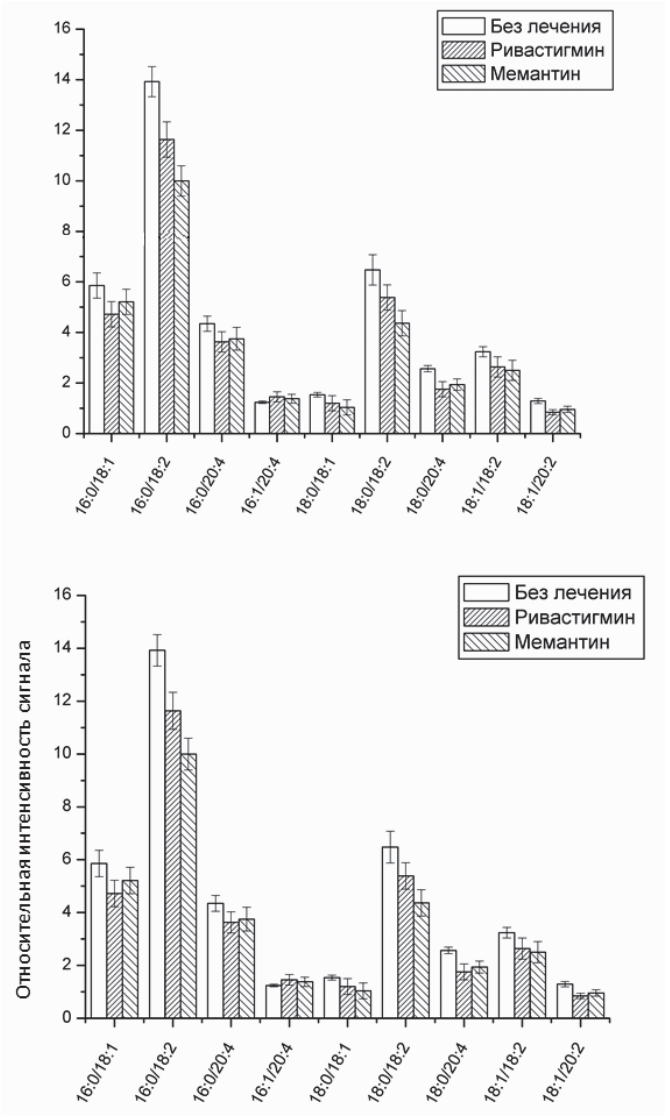


Рис. 1. Изменение содержания ФХ в плазме крови пациентов с болезнью Альцгеймера до и после лечения ривастигмином и мемантином

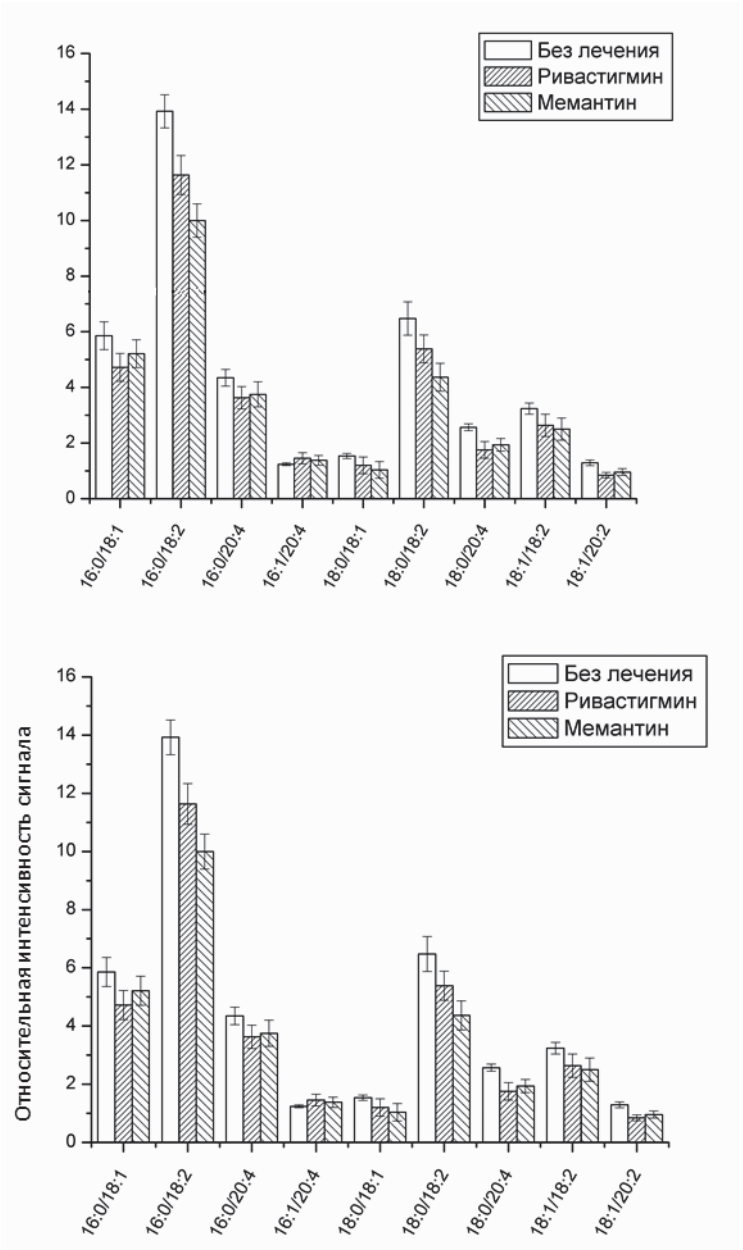


Рис. 2. Изменение содержания ЛФХ в плазме крови пациентов с болезнью Альцгеймера до и после лечения ривастигмином и мемантином

Следовательно, наши результаты указывают на то, что ингибитор АХЭ и БуХЭ, влияя на фермент-мишень, в конечном счете способен модифицировать фосфолипидный спектр плазмы крови пациентов в процессе лечения. Под влиянием этого ингибитора происходит снижение уровня холинсодержащих фосфолипидов. Это вполне закономерное явление, поскольку в результате действия ривастигмина сни-

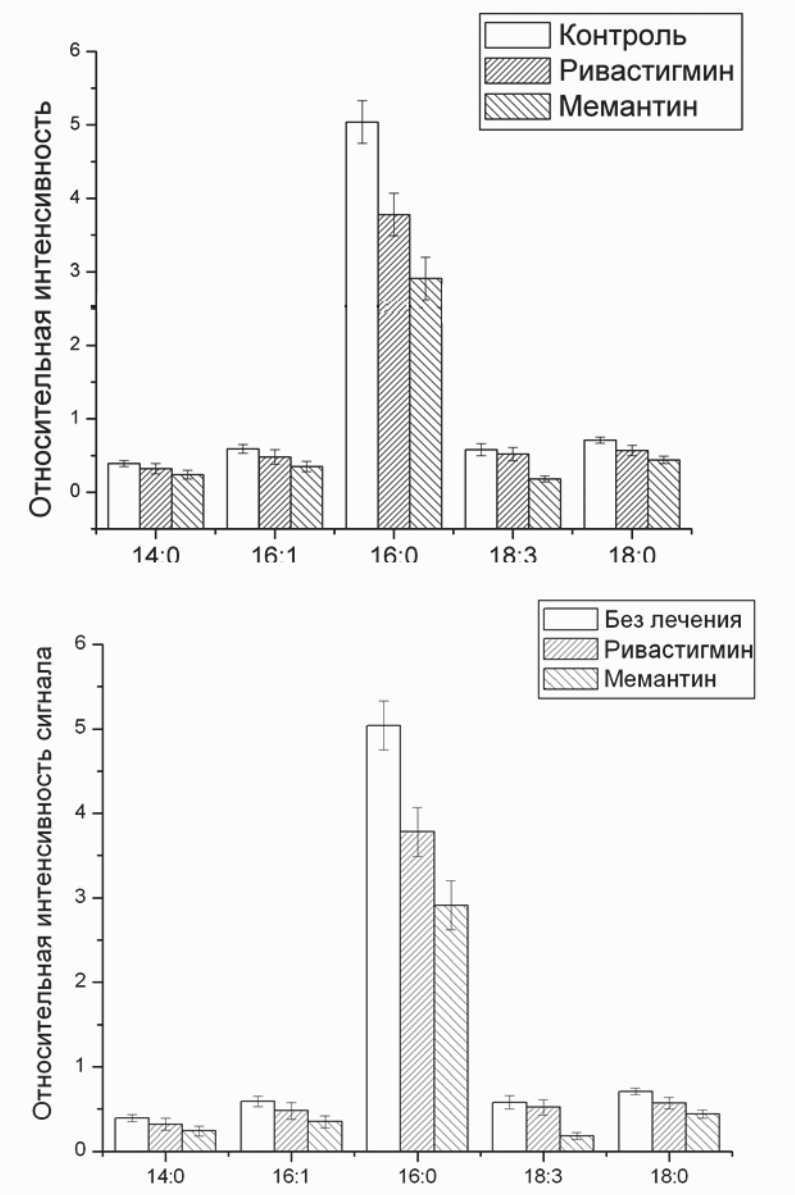


Рис. 3. Изменение содержания СФМ в плазме крови пациентов с болезнью Альцгеймера до и после лечения ривастигмином и мемантином

жается уровень свободного холина (Каратассо и др., 2008), являющегося структурным элементом изученных нами фосфолипидов. Ацетилхолин, который не расщепляется до холина и уксусной кислоты в присутствии ривастигмина, напротив, накапливается. Однако он не может быть непосредственно включен в тот метаболический путь синтеза фосфолипидов, в котором участвует свободный холин, что, вероятно, приводит к снижению синтеза холинсодержащих фосфолипидов (схема).

Однако до сих пор при изучении ингибиторов холинэстеразного ряда не уделялось внимания их влиянию на метаболизм сфингомиелина, хотя именно этот холинсодержащий фосфолипид является источником проапоптотических агентов, вызывающих гибель нейронов.

При действии ривастигмина и мемантина на спектр холинсодержащих липидов не было обнаружено однообразия в изменении содержания всех детектируемых молекул фосфолипидов. Содержание некоторых из них остается неизменным, в то время как в определенном виде фосфолипидных молекул отмечается заметное снижение их содержания в плазме после лечения мемантином (Каратассо и др., 2008).

Под действием этих двух препаратов с различными свойствами характер изменений фосфолипидов является однонаправленным. Следует подчеркнуть, что влияние ингибитора ХЭ на изменение уровня сфингомиелина в липидах крови пациентов с БА было установлено впервые (Каратассо и др., 2008). Также впервые обнаружено новое важное свойство препаратов, используемых в клинике для лечения БА. Возможно, что их способность влиять на липидный обмен вносит существенный вклад в эффективность терапии, проводимой данными препаратами.

Как показывает клиническая практика, наиболее эффективными являются те препараты, которые способны действовать на несколько мишеней. И это вполне логично, так как нейродегенеративные заболевания, к которым относится БА, имеют многофакторный характер и определяются множественностью патогенетических факторов, которые корректируются в случае успешного лечения заболевания. Нарушения в липидном метаболизме обнаруживаются при многих патологиях, поскольку структура мембраны клетки, а также процессы, происходящие на ее поверхности, определяются липидной составляющей мембраны. Следовательно, если медикаментозные препараты наряду с другими функциями способны вызывать коррекцию в липидном метаболизме, то они могут рассматриваться как более перспективные при лечении нейродегенераций, в том числе и альцгеймеровского типа.

Тестирование липидного спектра методом масс-спектрометрии может отражать успешность лечения исследуемым препаратом и в дальнейшем этот метод ввиду его широких возможностей по определению различных классов липидов может быть внедрен в клиническую практику для мониторинга эффективности лечения разных нейродегенеративных заболеваний, патогенез которых связан с нарушением липидного обмена, а также для отбора наиболее эффективных лекарств нового поколения, корректирующих липидный метаболизм.

Литература

Гаврилова С.И. Фармакотерапия болезни Альцгеймера. М.: Пульс, 2007.

Каратассо Ю.О., Суллард К., Федорова Я.Б. и др. Исследование методом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии фосфолипидного спектра плазмы крови пациентов с болезнью Альцгеймера при лечении ривастигмином (экселоном) и мемантином // Масс-спектрометрия. 2008. Т. 5. № 3. С. 106-116.

Нестерова И.В., Бобкова Н.В., Медвинская Н.И. и др. Морфофункциональное состояние нейронов височной коры и гиппокампа в сопоставлении с уровнем пространственной памяти у крыс после удаления обонятельных луковиц // Морфология. 2007. Т. 131. № 2. С. 32-36.

Островская Р.У., Бельник А.П., Сторожева З.И. Эффективность препарата «Ноопепт» при экспериментальной модели болезни Альцгеймера (когнитивный дефицит, вызванный введением бета-амилоида 25-35 в базальные ядра Мейнерта крыс) // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2008. Т. 146. С. 84-88.

Agira T., McDonald M.P., Yu R.K. Thematic Review Series: Sphingolipids. Role of ganglioside metabolism in the pathogenesis of Alzheimer's disease // J. Lipid Res. 2008. Vol. 49. P. 1157-1175.

Alessenko A.V. New research on Alzheimer's disease. Ed. E.M. Welsh. NY: Nova Science, 2006. P. 168-189.

Alessenko A.V., Bugrova A.E., Dudnik L.B. Connection of lipid peroxide oxidation with sphingomyelin cycle pathway in the development of Alzheimer's disease // Biochem. Soc. Transaction. 2004. Vol. 32. P. 144-146.

Arenz C. Small molecule inhibitors of acid sphingomyelinase // Cell. Physiol. Biochem. 2010. Vol. 26. P. 1-8.

Ariga T., Yanagisawa M., Wakade C. et al. Ganglioside metabolism in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease: expression of Chol-1α antigens in the brain // ASN Neuro. 2010. Vol. 2. P. e00044.

Bandaru V.V., Troncoso J., Wheeler D. et al. ApoE4 disrupts sterol and sphingolipid metabolism in Alzheimer's but not normal brain // Neurobiol. Aging. 2009. Vol. 30. P. 591-599.

Barrier L., Ingard S., Fauconneau B., Hage G. Gender-dependent accumulation of ceramides in the cerebral cortex of the APP(SL)/PS1Ki mouse model of Alzheimer's disease // Neurobiol. Aging**.** 2010. Vol. 31. P. 1843-1853.

Beal M.F. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration // Ann. Neurol. 2005. Vol. 58. P. 495-505.

Benedikz E., Kloskowska E., Winblad B. The rat as an animal model of Alzheimer's disease // J. Cell Mol. Med. 2009. Vol. 13. P. 1034-1042.

Bielawska A., Crane H.M., Liotta D. et al. Selectivity of ceramide-mediated biology. Lack of activity of erythro-dihydroceramide // J. Biol. Chem. 1993. Vol. 268. P. 26226-26232.

Bornemann K.D., Staufenbiel M. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease // Ann. NY Acad. Sci. 2007. Vol. 908. P. 260-266.

Buccoliero R., Futerman A.H. The roles of ceramide and complex sphingolipids in neuronal cell function // Pharmacological Research. 2003. Vol. 47. P. 409-419.

Chan R.B., Oliveira T.G., Cortes E.P. et al. Comparative lipidom Mielke ic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease // J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287. P. 2678-2688.

Chen S., Lee J.M., Zeng C. et al. Amyloid beta peptide increases DP5 expression via activation of neutral sphingomyelinase and JNK in oligodendrocytes // J. Neurochem. 2006. Vol. 97. P. 631-640.

Choo-Smith L.P., Surewicz W.K. The interaction between Alzheimer amyloid beta(1-40) peptide and ganglioside GM1-containing membranes // FEBS Lett. 1997. Vol. 402. P. 95-98.

Cutler R.G., Kelly J., Storie K. et al. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease // PNAS. 2004. Vol. 101. P. 2070-2075.

De Chaves E.P., Bussiere M., MacInnis B. et al. Ceramide inhibits axonal growth and nerve growth factor uptake without compromising the viability of sympathetic neurons // J. Biol. Chem. 2001. Vol**.** 276. P. 36207-36214.

Duan R.D. Alkaline sphingomyelinase: an old enzyme with novel implications // Biochim. Biophys. Acta. 2006. Vol. 1761. P. 281-291.

Eckert G.P., Cairns N.J., Maras A. et al. Cholesterol modulates the membrane-disordering effects of beta-amyloid peptides in the hippocampus: specific changes in Alzheimer's disease // Dement. Geriatr. Cogn. Disord. 2000. Vol. 11. P. 181-186.

Fantini J., Garmy N., Mahfoud R., Yahi N. Lipid rafts: structure, function and role in HIV, Alzheimer's and prion diseases // Exper. Rev. Mol. Med. 2002. Vol. 4. P. 1-22.

Fillipov V., Song M.A., Zhang K. et al. Increased ceramide in brains with Alzheimer's and other neurodegenerative diseases // J. Alzheimers Dis. 2012. Vol. 29. P. 537-547.

Gatt S. Enzymic hydrolysis and synthesis of ceramides // J. Biol. Chem. 1963. Vol. 238. P. 3131-3133.

Gottfries C.G., Karkson I., Svennerholm L. Membrane components separate early-onset Alzheimer's disease from senile dementia of the Alzheimer type // Int. Psychogeriatr. 1996. Vol. 8. P. 365-372.

Hakomori S. Structure, organization and function of glycosphingolipids in membrane // Curr. Opin. Hematol. 2003. Vol. 10. P. 16-24.

Han X., Holtzman, D., McKeel D.W. et al. Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis // J. Neurochemistry. 2002. Vol. 82. P. 809-818.

Han X., Fagan A.M., Cheng H. et al. Cerebrospinal fluid sulfatide is decreased in subjects with incipient dementia // Annals of Neurology. 2003. Vol. 54. P. 115-119.

Han X., Rozen S., Boyle S.H. et al. Metabolomics in early Alzheimer's disease: identification of altered plasma sphingolipidome using shotgun lipidomics // PLoS One. 2011. Vol. 6. P. e21643.
Hannun Y.A., *Obeid L.M.* Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids // Nature Reviews Molecular Cell Biol. 2008. Vol. 9. P. 139-150.
Haughey N.J., Bandaru V.R., Bai M., Mattson M.P. Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuropathogenesis // Biochim. Biophys. Acta. 2010. Vol. 1801. P. 878-886.
He X., Huang Y., Li B. et al. Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease // Neurobiology of Aging. 2010. Vol. 31. P. 398-408.
Hofmann K., Tomiuk S., Wolff G., Stoffel W. Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg^{2+}-dependent neutral sphingomyelinase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 5895-5900.
Horres C.R., Hannun Y.A. The roles of neutral sphingomyelinases in neurological pathologies // Neurochem. Res. 2012. Vol. 37. P. 1137-1149.
Huang Y., Tanimukai H., Liu F. et al. Elevation of the level and activity of acid ceramidase in Alzheimer's disease brain // Eur. J. Neurosci. 2004. Vol. 20. P. 3489-3497.
Jana A., *Pahan K.* Fibrillar amyloid-beta peptides kill human primary neurons via NADPH oxidase-mediated activation of neutral sphingomyelinase. Implications for Alzheimer's disease // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279. P. 51451-51459.
Jana A., Pahan K. Fibrillar amyloid-beta-activated human astroglia kill primary human neurons via neutral sphingomyelinase: implications for Alzheimer's disease // J. Neurosience. 2010. Vol. 30. P. 12676-12689.
Jana A, *Hogan EL, Pahan K.* Ceramide and neurodegeneration: susceptibility of neurons and oligodendrocytes to cell damage and death // J. Neurol. Sci. 2009. Vol**.** 278. P. 5-15.
Katsel P., *Li C., Haroutunian V.* Gene expression alterations in the sphingolipid metabolism pathways during progression of dementia and Alzheimer's disease: a shift toward ceramide accumulation at the earliest recognizable stages of Alzheimer's disease? // Neurochem. Res. 2007. Vol. 32. P. 845-856.
Kornburger J., Tripal P., Reichel M. et al. Functional Inhibitors of Acid Sphingomyelinase (FIASMAs): a novel pharmacological group of drugs with broad clinical applications // Cell. Physiol. Biochem. 2010. Vol. 26. P. 9-20.
Kosicek M., Zetterberg H., Andreasen N. et al. Elevated cerebrospinal fluid sphingomyelin levels in prodromal Alzheimer's disease // Neurosci Lett. 2012. Vol. 516. P. 302-305.
Lee J-T., *Xu J., Ku G. et al.* Amyloid-beta peptide induces oligodendrocyte death by activating the neutral sphingomyelinase-ceramide pathway // J. Cell Biol. 2004. Vol. 164. P. 123-131.
Levy M., Castillo S., Goldcorn T. nSMase2 activation and trafficking are modulated by oxidative stress to induce apoptosis // Biochiem. Biophys. Res. Commun. 2006. Vol. 344. P. 900-905.
Maceyka M., Harikumar K.B., Milstein S., Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease // Trends Cell Biol. 2012. Vol. 22. P. 50-60.
Mahfoud R., *Garmy N., Maresca M. et al.* Identification of a common sphingolipid-binding domain in Alzheimer, prion, and HIV-1 proteins // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. P. 11292-11296.
Malaplate-Armand C., Florent-Béchard S., Youssef I. et al. Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway // Neurobiol Dis. 2006. Vol. 23. P. 178-189.
Mao C., Obeid L.V. Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate // Biochim. Biophys. Acta. 2008. Vol. 1781. P. 424-434.
Masters C.L., Simms G., Weinman N.F. et al. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome // Proc. Natl. Acad Sci. USA. 1985. Vol. 82. P. 4245-4249.
Merrill A.H. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. P. 25843-25846.
Merrill A.H., Sullards M.C., Allegood J.C. et al. Sphingolipidomics: high-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry // Methods. 2005. Vol. 36. P. 207-224.
Merrill A.H. Jr., Stokes T.H., Momin A. et al. Sphingolipidomics: a valuable tool for understanding the roles of sphingolipids in biology and disease // J. Lipid Res. 2009. Vol. 50. P. S97-102.
Mielke M., *Lyketsos G.* Alterations of the sphingolipid pathway in Alzheimer's disease: new biomarkers and treatment targets? // Neuromolecular Med. 2010. Vol. 12. P. 331-340.

Mielke M.M., *Haughey N.J., Bandaru V.V. et al.* Plasma ceramides are altered in mild cognitive impairment and predict cognitive decline and hippocampal volume loss // Alzheimers Diment. 2010. Vol. 6. P. 378-385.

Mielke M.M., *Haughey N.J., Bandaru V.V. et al.* Plasma sphingomyelins are associated with cognitive progression in Alzheimer's disease // J. Alzheimer's Dis. 2011. Vol. 27. P. 259-269.

Nilsson A. The presence of spingomyelin- and ceramide-cleaving tnzymes in the small intestian ytact // Biochim. Biophys. Acta. 1969. Vol. 176. P. 339-347.

Obeid L.M., Lenardic C.M., Karolak L.A., Hannun Y.A. Programmed cell death induced by ceramide // Science. 1993. Vol. 259. P. 1769-1771.

Park J.H., Schuchman E.H. Acid ceramidase and human disease // Biochim. Biophys. Acta. 2006. Vol. 1758. P. 2133-2138.

Pettegrew J.W., Panchalingham K., Hamilton R.L., McClure R.J. Brain membrane phospholipid alterations in Alzheimer's disease // Neurochem. Res. 2001. Vol. 26. P. 771-782.

Pettus B.J., Chalfant C.E., Hannun Y.A. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives // Biochim. Biophys. Acta. 2002. Vol. 1585. P. 114-125.

Pruett S.T., Bushnev A., Hagedorn K. et al. Biodiversity of sphingoid bases («sphingosines») and related amino alcohols // J. Lipid Res. 2008. Vol. 49. P. 1621-1639.

Satoi H., Tomimoto H., Ohtani R. et al. Astroglial expression of ceramide in Alzheimer's disease brains: a role during neuronal apoptosis // Neurosience. 2005. Vol. 130. P. 657-666.

Selkoe D.J. Cell biology of the amyloid beta-protein precursor and the mechanism of Alzheimer's disease // Annu. Rev. Cell. Biol. 1994. Vol. 10. P. 373-403.

Seyfried T.N., Yu R.K. Cellular localization of gangliosides in the mouse cerebellum: analysis using neurological mutants // Adv. Exp. Med. Biol. 1984. Vol. 174. P. 169-181.

Shepardson N.E., Shankar G.M., Selkoe D.J. Cholesterol level and statin use in Alzheimer disease: II. Review of human trials and recommendations // Arch. Neurol. 2011. Vol. 68. P. 1385-1392.

Shupik M.A., Vanin A.F, Alessenko A.V. Interaction of the nitric oxide signaling system with the sphingomyelin cycle and peroxidation on transmission of toxic signal of tumor necrosis factor-α in ischemia-reperfusion // Biochemistry (Mosc). 2011. Vol. 76. P. 1197-1209.

Soderberg M., Edlund C., Alafuzoff I. et al. Lipid composition in different regions of the brain in Alzheimer's disease/senile dementia of Alzheimer's type // J. Neurochem. 1992. Vol. 59. P. 1646-1653.

Spence M.W., Byers D.M., Palmer F.B., Cook H.W. A new Zn^{2+}-stimulated sphingomyelinase in fetal bovine serum // J. Biol. Chem. 1989. Vol. 264. P. 5358-5363.

Stepanichev M.Y., Moiseeva Y.V., Lazareva N.A., Gulyaeva N.V. Studies of the effects of fragment (25-35) of beta-amyloid peptide on the behavior of rats in a radial maze // Neurosci. Behav. Physiol. 2005. Vol. 35. P. 511-518.

Sullard M.C., Wang E., Peng Q., Merrill A.H.Jr. Functional lipidomics // Echelon Biosciences. Eds. L. Feng, G.D. Prestwich. Salt Lake City, 2005. P. 159-189.

Taguchi M., *Sugimoto K., Akama T. et al.* Sphingomyelin analogues as inhibitors of sphingomyelinase // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003. Vol. 13. P. 1963-1966.

Vetrivel K.S., Thinakaran G. Membrane rafts in Alzheimer's disease beta-amyloid production // Biochim. Biophys. Acta. 2010. Vol. 1801. P. 860-867.

Walsh D.M., *Klyubin I., Fadeeva J.V. et al.* Amyloid-beta oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition // Biochem. Soc. Trans. 2002. Vol. 30. P. 552-557.

Xuan N.T., Shumilina E., Kempe D.S. et al. Sphingomyelinase dependent apoptosis of dendritic cells following treatment with amyloid peptides // J. Neuroimmnol. 2010. Vol. 219. P. 81-89.

Yanagisava K. Role of gangliosides in Alzheimer's disease // Biochim. Biophys. Acta. 2007. Vol. 1768. P. 1943-1951.

Yanagisava K., Odaka A., Suzuki N., Ihara Y. GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein (A beta): a possible form of preamyloid in Alzheimer's disease // Nat. Med. 1995. Vol. 1. P. 1062-1066.

Yang D-I., Yeh C-H., Chen S., Xu J., Hsu C.Y. Neutral sphingomyelinase activation in endothelial and glial cell death induced by amyloid beta-peptide // Neurobiol. Dis. 2004. Vol. 17. P. 99-107.

Yu Z.F., Nikolaeva-Karakashian M., Zhou D. et al. Pivotal role for acidic sphingomyelinase in cerebral ischemia-induced ceramide and cytokine production, and neuronal apoptosis // J. Mol. Neurosci. 2000. Vol. 15. P. 85-97.

Zeng C., Lee J.T., Chen S. et al. Amyloid-beta peptide enhances tumor necrosis factor-alpha-induced iNOS through neutral sphingomyelinase/ceramide pathway in oligodendrocytes // J. Neurochem. 2005. Vol. 94. P. 703-712.

Zhang S.C., *Ge B., Duncan I.D.* Adult brain retains the potential to generate oligodendroglial progenitors with extensive myelination capacity // Proc. Nathl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 4086-4094.

ДИСФУНКЦИЯ СИНАПСОВ ПРИ НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ И СТАРЕНИИ

А.Л. Шварцман, С.В. Саранцева

Содержание

1. Введение
2. Болезнь Альцгеймера
3. Болезнь Паркинсона
4. Болезнь Гентингтона
5. Прионные болезни
6. Боковой амиотрофический склероз
7. Возрастные изменения в синапсах

1. Введение

В исследованиях нейродегенеративных заболеваний человека, проводимых, как правило, на аутопсийном материале, отмечаются два основных патоморфологических признака: накопление множественных (экстраклеточных или внутриклеточных) агрегатов различных белков и прогрессирующая гибель нейронов в структурах головного мозга (Иллариошкин, 2003). Между тем, все большее число данных наглядно демонстрирует, что дисфункция и дегенерация синапсов предшествует гибели нейронов и характеризует наиболее ранние стадии заболевания. Более того, эти данные поддерживают идею о том, что синаптические нарушения, возникающие как непосредственные последствия генных мутаций или модификаций клеточных процессов, определяют инициацию и прогрессирование заболевания (Wishart et al., 2006).

В совокупности, результаты последних исследований позволяют предположить существование общих молекулярных и клеточных механизмов НДЗ, вызывающих дисфункцию или дегенерацию синапсов. Наибольшей популярностью пользуется гипотеза «компартментализованной нейродегенерации», предполагающая специфическую регуляцию нейродегенеративных процессов в различных компартментах нейронов. Гипотеза предполагает, что нейродегенерация и гибель сомы, аксонов, дендритов и синаптических терминалов регулируются независимо (Gillingwater, Ribchester, 2001). Следует отметить, что многие процессы неонатального периода происходят подобным образом. Так, выживаемость неонатальных мотонейронов прямо зависит от поддержания синаптического контакта с мышцами. В норме эти мотонейроны гибнут от апоптоза спустя несколько дней после нарушения синаптического контакта. Предполагается, что синаптическая терминаль аксона ха-

Сокращения: БА – болезнь Альцгеймера; БАС – боковой (латеральный) амиотрофический склероз; БГ – болезнь Гентингтона; БП – болезнь Паркинсона; Аβ – β-амилоидный пептид; GFP – зеленый флуоресцентный белок; LTP – долговременная потенциация; NMDA – N-метил-D-аспартат; PrP – прионный белок.

рактеризуется повышенной чувствительностью к нейродегенерации (Gillingwater, Ribchester, 2001; Coleman et al., 2004). Основным процессом в регулируемой нейродегенерации синапсов является так называемый «синаптоз», представляющий собой локализованный в синаптических структурах каскад апоптоза (Gillingwater, Ribchester, 2001). Синаптоз предполагает, что активация каспаз в синаптических компартментах может осуществляться агрегатами аномальных белковых продуктов или происходить при инициации клеточных проапоптических процессов, пространственно локализованных в синапсах (Mattson et al., 1998; Mattson, 2000; Gilman, Mattson, 2002).

Интересно, что многие синаптические белки содержат амилоидогенный домен, который в случае мутаций или в условиях стресса может приводить к аномальной конформации белка, образованию нейротоксических агрегатов, воздействующих на синапсы (рис. 1). Наиболее распространенными амилоидогенными белками, вызывающими синаптические нарушения, являются амилоид-β-протеин (Aβ) при болезни Альцгеймера, прионовые белки при прионовых болезнях, гентингтин при болезни Гентингтона, α-синуклеин при болезни Паркинсона. Следует отметить, что, несмотря на обнаружение белков или их агрегатов, регулирующих гибель синапсов, трудно представить существование одного, общего для всех НДЗ, механизма синаптоза. Поэтому для разработки синаптозащитной терапии необходимо знание механизма дисфункции и дегенерации синапсов для каждого отдельного заболевания.



Рис. 1. Амилоидогенные синаптические белки вызывают синаптические нарушения и нейродегенерацию (Masliah et al., 2001)

2. Болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера (БА) представляет собой наиболее часто встречающееся НДЗ пожилого возраста, которое характеризуется прогрессирующей потерей памяти, расстройством речи, распадом интеллекта и психической деятельности (Davis, Samuels, 1998).В настоящий момент накапливается все больше данных о том, что в мозге больных БА наблюдается значительная потеря синапсов (Masliah et al., 2001; Davies et al., 1987; DeKosky, Scheff, 1990; Selkoe, 2002). Характерно, что дисфункция синапсов сопровождалась нарушением тех когнитивных функций, которые характеризуют наиболее ранние симптомы заболевания. При этом потеря синапсов наблюдалась даже при незначительных когнитивных нарушениях, которые могли трактоваться как предшествующие БА (Scheff et al., 2007). Более того, когнитивные нарушения были отмечены еще до постановки клинического диагноза БА (Elias et al., 2000; Kawas et al., 2003). Приводятся данные о том, что, прежде чем нейроны умирают в мозге больных с БА, в них происходят синаптические изменения, приводящие к последовательности когнитивных нарушений (Coleman et al., 2004). При этом существует значительная часть «живых» нейронов, потерявших синапсы (Coleman et al., 2004; Hatanpaa et al., 1999). Потеря синапсов у «живых» нейронов, в частности, связана с нарушением структуры дистальных дендритов на самых ранних стадиях БА (Braak et al., 1994). Примечательно, что эти нарушения предшествуют снижению активности холин-ацетилтрансферазы (Tiraboschi et al., 2000). В целом, потеря синапсов коррелирует лучше других патологических признаков с нарушением когнитивных функций и может считаться основой в патогенезе БА (DeKosky et al., 1996; Coleman, Yao, 2003).

Ряд исследований предполагает, что дисфункция и потеря синапсов при БА связаны с нарушением экспрессии синаптических белков (Masliah, Terry, 1993; Davidsson, Blennow, 1998). Так, снижение содержания синаптофизина обнаружено на самых ранних стадиях БА (Masliah et al., 2001). Нарушение экспрессии генов белков синаптических везикул было показано и у трансгенных животных с экспрессией предшественника амилоид β-протеина (*APP*) (Chapman et al., 1999). Следует заметить, что нарушения структуры синапсов и экспрессии синаптических белков отражают наиболее ранние стадии БА и предшествуют образованию амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков (Cataldo et al., 2000).

По современным представлениям, образование токсичных олигомеров амилоид-β-протеина (Аβ) является основной причиной потери и дисфункции синапсов при БА. Действительно, потеря синапсов происходит в непосредственной близости от амилоидных бляшек, предполагая, что они могут быть источником токсичных олигомеров Аβ (Tsai et al., 2004).

Детальный механизм олигомеризации Аβ и структура образующихся промежуточных соединений при образовании амилоидных фибрилл до настоящего времени изучены недостаточно. Тем не менее, установлено, что среди олигомеров присутствуют растворимые димеры, тримеры, додекамеры, олигомеры более высокого порядка, обозначаемые в литературе как ADDL («Аβ-derived diffusible ligands»), и протофибриллы (Lambert et al., 1998; Walsh et al., 1999).

Синтетические Аβ-олигомеры, или олигомеры, выделенные из культуральной среды клеток, экспрессирующих мутантный *APP*, в экспериментах *in vivo* и *in vitro* индуцируют синаптические нарушения (Enya et al., 1999; Walsh et al., 2002). При этом димеры и тримеры Аβ обладают наиболее выраженным эффектом в ингибировани долговременной потенциации (LTP, long-term potentiation) (Townsend et al., 2006; Shankar et al., 2007). Следует отметить, что олигомеры Аβ вызывают значительные нарушения когнитивных функций у животных как при инъекциях в мозг (O'Hare et al., 1999; Cleary et al., 2005), так и на трансгенных моделях (Mucke et al., 2000).

Дисфункция синапсов, вызванная олигомерами Аβ, имеет достаточно сложный механизм, связанный с нарушением гомеостаза Ca^{2+} и функций N-methyl-D-aspartate (NMDA) рецепторов (Mucke et al., 2000; Citri, Malenka, 2008; Liu et al., 2004). Долговременная потенциация физиологически зависит от притока Ca^{2+} через NMDA-рецепторы и происходит при повышении его концентрации (Kullmann, Lamsa, 2007; Bezprozvanny, Mattson, 2008). Интересно, что мутации в гене пресенилина 1 (*PS1*), вызывающие раннюю семейную форму БА, усиливают накопление Ca^{2+} в эндоплазматическом ретикулуме и приводят к дефектам LTP (Popugaeva et al., 2007). Олигомеры Аβ ингибируют индукцию LTP и вызывают нарушение структуры дендритов и коллапс синапсов, который проявляется в когнитивных нарушениях (Palop, Mucke, 2010). Так, инъекции в мозг синтетических или природных Аβ-олигомеров изменяют поведение животных, включая память и когнитивные функции (O'Hare et al., 1999; Cleary et al., 2005). Нейтрализация растворимых Аβ-олигомеров с помощью Аβ-антител нормализует аномалии поведения в различных линиях трансгенных животных (Kotilinek et al., 2002; Dodart et al., 2002; Klyubin et al., 2005).

Исследование больных с БА показало, что уровень растворимых олигомеров Аβ, но не сенильных бляшек, коррелирует с остротой потери памяти, хотя вклад различных олигомеров в когнитивные нарушения остается неясным (Gong et al., 2003). Следует заметить, что попытки терапевтического лечения БА снижением общего уровня олигомеров путем уменьшения концентрации Аβ должны учитывать, что Аβ в нормальных физиологических концентрациях индуцируют LTP и нормальные синаптические функции, и только аномально высокие концентрации Аβ вызывают нейротоксические эффекты (Venkitaramani et al., 2007; Puzzo et al., 2008).

В целом, хотя приведенные выше данные предполагают, что именно повышенная генерация нейротоксических Аβ-олигомеров приводит к дегенерации и дисфункции синапсов, анализ литературы показывает, что ситуация является более сложной. Так, трансгенные мыши с полным выключением экспрессии генов *PS1* и его гомолога *PS2* в переднем мозге («conditional double knockout») в постнатальный период характеризуются потерей памяти, потерей синапсов и развитием нейродегенеративных процессов, т.е. классической картиной раннего нейропатологического процесса БА в отсутствие генерации Ab (Saura et al., 2004).

В рамках программы «Фундаментальные науки – медицине» мы провели оценку изменений в синапсах при гиперэкспрессии *PS1* человека, его мутантных форм и последовательности $Aβ_{42.}$ Мы исследовали распределение пресинаптических бел-

ков синаптотагмина 1 (synaptotagmin 1, syt1) и синаптобревина (n-synaptobrevina, n-syb), меченых зеленым флуоресцентным белком (GFP), в трансгенных линиях *Drosophila melanogaster* с экспрессией в нервных клетках *PS1*. Методом конфокальной микроскопии мы проанализировали распределение syt1-GFP и n-syb-GFP в отделах мозга, отвечающих за ассоциативное обучение и память, грибовидных телах и каликсе. Анализ распределения syt1-GFP в мозге *Drosophila* на 30-й день жизни животных показал, что уровень syt1, оцененный по уровню относительной флуоресценции GFP, в грибовидном теле при экспрессии гена *PS1* и последовательности $A\beta_{42}$ не отличается от такового в контроле. В то же время, в каликсе уровень syt1 резко снижен. То же самое было выявлено при совместной экспрессии *PS1* дикого типа и последовательности $A\beta_{42}$. При этом в случае совместной экспрессии последовательности $A\beta_{42}$ и мутантного *PS1* уровень этого белка в каликсе по сравнению с контролем не снижался, а увеличивался.

Другая картина наблюдалась при анализе распределения n-syb-GFP. При экспрессии *PS1* его уровень был уменьшен по сравнению с контролем в грибовидном теле и в каликсе, хотя в каликсе снижение и не было столь сильным, как в случае с syt1. Однако в случае совместной экспрессии последовательности $A\beta_{42}$ и мутантного *PS1(PSN1.P267S)* количество этого белка в каликсе по сравнению с контролем было также не снижено, а повышено. Эти эксперименты указывают, что нарушение функций синаптических белков может вносить существенный вклад в дисфункцию синапсов.

3. Болезнь Паркинсона

Болезнь Паркинсона (БП) – второе по частоте встречаемости после болезни Альцгеймера прогрессирующее нейродегенеративное заболевание человека. Частота встречаемости БП среди лиц старше 60 лет составляет 1–2%. Симтомокомплекс заболевания (тремор, ригидность и брадикинезия) обусловлен гибелью дофаминэргических нейронов черной субстанции мозга человека. Постановка диагноза производится на основании развития симптомов заболевания, которые проявляются при гибели 80% дофаминергических нейронов черной субстанции (Dawson, Dawson, 2003; Savitt et al., 2006). Исследования последних лет показали, что дисфункция синапсов проявляется во многих моделях БП на животных и может быть ключевым фактором в развитии БП (Bagetta et al., 2010; Dawson et al., 2010; Plowey, Chu, 2011; Belluzzi et al., 2012; Picconi et al., 2012). Хотя большинство случаев БП являются спорадическими, сегодня известно пять генов, мутации в которых приводят к развитию БП, α-синуклеин (*SNCA*), паркин (*PARK2*), *DJ-1*, *PINK1* и обогащенная лейциновыми повторами киназа 2 (*LRRK2*) (Nuytemans et al., 2010). Как правило, продукты этих генов связаны с синаптическими функциями.

Альфа-синуклеин (*SNCA*) является ключевым компонентом патологических процессов нейродегенерации при БП (Sidhu et al., 2004; Recchia et al., 2004). Хотя его физиологические функции в норме на сегодняшний день изучены недостаточно, многочисленные наблюдения предполагают, что основная функция этого белка

заключается в регуляции содержания дофамина в нейронах (Bonanomi et al., 2006; Bellani et al., 2010) и поддержании структурной целостности синапсов (Murthy, De Camilli , 2003; Fortin et al., 2005).

Мутации в гене *SNCA* A53T, A30P, E46K (Polymeropoulos et al., 1997; Kruger et al., 1998; Zarranz et al., 2004), а также дупликация и трипликация гена (Chartier-Harlin et al., 2004; Singleton et al., 2003) вызывают аутосомно-доминантную форму БП. При этом мутации и мультипликации гена *SNCA*, определяющие нарушение структуры или избыточное накопление этого белка, приводят к образованию олигомеров и агрегатов SNCA, которые являются главными компонентами телец Леви, нейрональных цитоплазматических включений (Spillantini et al., 1997). Тельца Леви наблюдаются как при идиопатических и семейных формах БП, так и в экспериментах на трансгенных животных (Baba et al., 1998; Trojanowski, Lee, 1998; Wan et al., 2012).

Основная загадка нейротоксичности SNCA заключается в селективной нейродегенерации нейронов, синтезирующих дофамин и локализованных в черной субстанции мозга. Логично предположить, что предрасположенность этих нейронов к нейродегенерации определяется именно дофамином, вызывающим агрегацию SNCA, которая может быть ключевой характеристикой нейродегенерации при БП. Именно образованные в результате агрегации SNCA олигомеры являются, по мнению многих исследователей, первичными агентами, приводящими к дисфункции и дегенерации синапсов при БП (Bate et al., 2010; Scott et al., 2010; Diógenes et al., 2012).

Исследование свойств SNCA показало, что он является одним из основных белков пресинаптического терминала, участвует в образовании и транспорте синаптических везикул, синтезе и освобождении дофамина (Sidhu et al., 2004; Scott et al., 2012; Yavich et al., 2004). Все эти свойства указывают на важную роль *SNCA* в образовании и поддержании синапсов. Интересно, что мутантный SNCA нарушает гомеостаз дофамина, что может обусловливать нарушение синаптогенеза и нейротрансмиссии при БП (Lotharius et al., 2002).

Среди всех случаев семейных форм БП наиболее часто встречаются мутации в гене обогащенной лейциновыми повторами киназы 2 (*LRRK2*) до 13% (Paisan-Ruíz et al., 2004; Zimprich et al., 2004). При этом среди спорадических случаев БП частота мутаций в гене *LRRK2* достигает 1–2% (Berg et al., 2005; Taylor et al., 2006). Хотя молекулярные механизмы процессов, в которых задействована LRRK2, изучены недостаточно, известно, что этот белок является одним из основных регуляторов морфологии синапсов. В экспериментах на нейромышечных контактах *Drosophila* показано, что на постсинаптическом уровне LRRK2 взаимодействует с субстратом 4E-BP, известным как ингибитор синтеза белка, а на пресинаптическом уровне LRRK2 образует комплекс с тубулином и фосфорилирует ассоциированный с микротрубочками белок Futsch, который регулирует рост аксонов и дендритов и необходим для нормального синаптогенеза (Lee et al., 2010). В ряде работ также показано, что *LRRK2* контролирует образование и эндоцитоз синаптических везикул (Shin et al., 2008; Piccoli et al., 2011; Matta et al., 2012). Наконец, установлено, что мутация R1441C в гене *LRRK2* приводит к нарушению дофаминергической нейротрансмиссии у трансгенных мышей (Tong et al., 2009).

Мутации в гене *PARK2* являются наиболее частой причиной раннего аутосомно-рецессивного паркинсонизма, включающего как спорадические, так и семейные случаи (Zhang et al., 2000). Продукт гена *PARK2*, паркин, представляет собой убиквитин-протеин-лигазу типа Е3, функция которой заключается в доставке аномально конформированных белков в протеасомный комплекс для последующего расщепления. Часть субстратов паркина, включая CDCrel-1, гликозилированный SNCA, синаптотагмин и синфилин участвуют в синаптической трансмиссии (Zhang et al., 2000; Huynh et al., 2003). У паркина выявлено многообразие клеточных функций, одна из которых – регуляция функций и стабильности глутаматергических синапсов. Так, нокдаун паркина, или гиперэкспрессия БП-ассоциированных мутантов *PARK2* приводит к пролиферации глутаматергических синапсов (Helton et al., 2008).

Аутосомно-рецессивная форма паркинсонизма, вызванна мутациями в гене *DJ-1*, встречается лишь в 1–2% случаев ранней БП (Hedrich et al., 2004). Белок DJ-1 обладает активностью антиоксиданта и митохондриального шаперона (Thomas, Beal, 2007). Показано, что DJ-1 необходим для подержания долговременной депрессии в СА1 синапсах гиппокампа (Wang et al., 2008).

PINK1-форма аутосомно-рецессивного паркинсонизма обусловливает от 1 до 9% всех случаев паркинсонизма с ранним началом симптомов (Klein et al., 2006). Белок PINK1 является высококонсервативной митохондриальной протеинкиназой и его дефицит вызывает выраженные аномалии в дофаминергической нейротрансмиссии (Kitada et al., 2007).

4. Болезнь Гентингтона

Болезнь Гентингтона (БГ) является НДЗ с аутосомно-доминантным типом наследования. БГ приводит к прогрессирующей деменции, появлению психопатологической симптоматики и хореиформным движениям, и к преждевременной смерти (Landles et al., 2004).

В основе БГ лежит увеличение размера полиглютаминового домена в белке гентингтине (huntingtin), функция которого пока не вполне понятна. В норме длина CAG-повтора в гене гентингтина варьирует у разных индивидуумов от 10 до 34 триплетов. У больных его длина колеблется от 35 до более чем 100 кодонов. Аномальные полиглютаминовые белки формируют нерастворимые белковые агрегаты, образование которых сопровождается дисфункцией нейронов и их гибелью (Landles et al., 2004; Aronin et al., 1995; Trottier et al., 1995). Предполагается, что нарушение функционирования убиквитин-протеосомной системы приводит к тому, что в клетках не происходит деградации мутантного гентингтина, что и является основной причиной образования и накопления его агрегатов (Bence et al., 2001). Агрегаты гентингтина накапливаются преимущественно в ядрах клеток и оказывают выраженный токсический эффект на аксонный транспорт к пресинаптическому терминалу (Li et al., 2001; Nucifora et al., 2003).

Как правило, БГ характеризуется поздним началом заболевания, хотя ювенильные формы встречаются, когда количество повторов CAG превышает 60 (Raymond

et al., 2011). По другим данным, начало заболевания коррелирует с количеством CAG-кодонов (Becher et al., 1998). В основном нейродегенерация затрагивает кору головного мозга и стриатум, однако на поздних стадиях заболевания потеря нейронов отмечалась и в других отделах мозга (Vonsattel et al., 1985). В настоящее время доказано, что ранние когнитивные нарушения появляются у пациентов до наступления классических симптомов заболевания (Lawrence et al., 1998). Более того, результаты исследование аутоптатов больных предполагают, что первые симптомы заболевания (моторные и когнитивные) появляются еще до гибели нейронов (Vonsattel et al., 1985; Mizuno et al., 2000).

Отличительными ранними морфологическими изменениями в нейронах как при БГ, так и в трансгенных моделях являлась дегенерация дендритов, указывающая на дисфункцию синапсов (DiFiglia et al., 1997; Guidetti et al., 2001). Структурные изменения в нейронах сопровождались выраженными нарушениями экспрессии синаптических белков, состав которых был идентичен в аутоптатах больных с БГ и трансгенных животных и не зависел от длины и дозы гентингтина (Cha et al., 2007; Kuhn et al., 2007).

Эксперименты на трансгенных животных показали, что нарушение когнитивных функций и моторных реакций предшествует гибели нейронов и наблюдается при нарушении структуры дендритов и снижении глутаматергической нейротрансмиссии в стриатуме (Cepeda et al., 2010; Milnerwood, Raymond, 2010). При этом, подобно результатам, полученным на больных, эксперименты на трансгенных животных показали, что ранние когнитивные нарушения предшествуют моторной дисфункции (Van Raamsdonk et al., 2005; Paulsen et al., 2008).

В нейронах гентингтин ассоциирует с различными белками, связанными так или иначе с синаптическими функциями (Wood et al., 1996). Мутантный гентингтин может подавлять экспрессию генов, кодирующих дофаминовые D1-, D2- и D3-рецепторы, локализованные как на пресинаптическом, так и постсинаптическом компартментах (Dunah et al., 2002). Мутантный гентингтин, взаимодействуя с синаптическими везикулами, вызывает нарушение экзоцитоза и эндоцитоза, приводящее к нарушению нейротрансмиссии (Li et al., 2003a). Эти факты указывают, что в основе БГ может лежать синаптопатология (Li et al., 2003b).

Существующие данные предполагают, что именно нейротрансмиссия глутамата индуцирует повышенную токсичность глутамата в стриатуме (Zeron et al., 2002; André et al., 2010). В целом, анализ литературы указывает, что синаптические дефекты являются ключевыми факторами в патогенезе БГ.

5. Прионные болезни

Прионные болезни – это губчатые энцефалопатии млекопитающих, включающие бычью губчатую энцефалопатию, или коровье бешенство, скрапи овец и некоторые нейродегенеративные заболевания человека – болезни Крейцфельда-Якоба и Герстмана-Штраусслера-Шейнкера, семейная фатальная бессонница и куру (Иллариошкин, 2003; Prusiner, 1998, Гусев, 2004). Агент, вызывающий скрепи, является

белком, получившим название «прион» (*prion –pro*teinacious *in*fectious particle), PrP (Prion Protein) (Prusiner, 1998). PrP является мембранным белком, который в основном экспрессируется в клетках центральной нервной системы и лимфоретикулярной ткани. Нормальная форма белка PrP обозначается PrP^{C}. Патологическая форма этого белка, обуславливающая инфекционность, была названа PrP^{Sc} (форма PrP, связанная со scrapie). PrP^{Sc} неотличим от PrP^{C} по аминокислотной последовательности, но имеет другую конформацию (Stahl et al., 1993). Инфекционным агентом является белок PrP^{Sc}, а превращение белка из нормальной формы (PrP^{C}) в инфекционную (PrP^{Sc}) происходит путем конформационного перехода (Prusiner, 1998). Было показано, что PrP^{C} содержит преимущественно α-спиральные участки, тогда как в составе PrP^{Sc} в основном представлены β-структуры (Гусев, 2004).

Основные патологические черты прионных болезней включают губчатую дегенерацию мозга, сопровождаемую гибелью нейронов, синаптические изменения астроглиоз и накопление в организме больного PrP^{Sc} (Prusiner, 1998). Иммуногистохимические методы определяли PrP^{Sc} преимущественно в ЦНС, как в нейронах, так и глиальных клетках (Kretzschmar et al., 1986; Moser et al., 1995), но также и в переферических тканях, в основном в лимфатической системе (Hilton et al., 2002; Budka, 2003). Интересно, что в мозге отложения PrP^{Sc} представляли собой амилоидные бляшки и фибриллы (Prusiner, 1983). Примечательно, что фрагмент рекомбинантного приона мыши, экспрессированный в *Escherichia coli*, образует амилоидные фибриллы *in vitro*, которые при введении трансгенным мышам, экспрессирующим этот же фрагмент, вызывают развитие неврологической картины прионного заболевания (Legname et al., 2004).

Интересно, что у мышей, зараженных скрепи, отложения PrP^{Sc}, так же как и синаптические изменения, предшествуют гибели нейронов (Jeffrey et al., 2000). Следует отметить, что уменьшение числа дендритных шипиков было характерным не только для различных моделей скрепи (Jeffrey et al., 2000; Johnston et al., 1997), но также и для больных с болезнью Крейцфельда-Якоба (Landis et al., 1981). Было отмечено, что когнитивные нарушения, так же как и нарушения структуры дендритов, происходят на самых ранних стадиях нейропатогенеза прионных болезней (Cunningham et al., 2003; Ishikura et al., 2005).

Прионные болезни человека обычно диагностируются при развитой деменции и превалировании моторной симптоматики. У мышей о развитии заболевания судят по нарушениям опорно-двигательного аппарата, гибели нейронов и отложениях PrP^{Sc}. В то же время существуют более ранние поведенческие симтомы, которые предшествуют гибели нейронов и отражают дисфункцию и потерю синапсов (Guenther et al., 2001; Cunningham et al., 2005).

Ключевыми экспериментами в понимании патологии прионных болезней стали эксперименты, доказывающие, что ранние губчатые изменения обратимы после нокаута гена PrPC (Mallucci et al., 2003; Mallucci, 2009). Авторы показали, что у мышей, зараженных скрепи, выключение гена PrPC предотвращало гибель нейронов и развитие заболевания. Выключение гена PrPC было произведено через 8 недель после инфекции и за четыре недели до обычно диагностируемых моторных симптомов. Тесты показали, что на этой стадии происходят синаптические изменения,

подтвержденные электофизиологически. Гистопатологический анализ демонстрировал наличие спонгиоза, глиоза и PrPSc-отложений. Однако ни гибели нейронов, ни значительных накоплений PrPSc-агрегатов обнаружено не было. Более того, элиминация PrPC приводила к существенному восстановлению поведенческих, физиологических и гистопатологических признаков (Mallucci et al., 2007).

Таким образом, было получено прямое доказательство, что в основе прионных болезней лежат синаптические нарушения, а не гибель нейронов. Более того, эти результаты указывают, что основным агентом в развитии заболевания могут быть интермедиаты агрегатов прионов, а не непосредственно PrPSc.

6. Боковой амиотрофический склероз

Боковой (латеральный) амиотрофический склероз (БАС), также известный как болезнь моторных нейронов, представляет собой НДЗ, вызываемое избирательным поражением периферических двигательных нейронов передних рогов спинного мозга и двигательных ядер ствола мозга, а также корковых (центральных) мотонейронов и боковых столбов спинного мозга. Заболевание характеризуется неуклонно прогрессирующим течением, приводящим к развитию амиотрофий, параличей и спастичности (Rowland, Shneider, 2001; Boillee et al., 2006).

БАС в основном является спорадическим заболеванием, семейные формы выявлены не более чем у 10% больных. В настоящее время при анализе семейных случаев БАС выявлено 10 локусов, связанных с развитием моногенных форм заболевания. К ним относятся дефекты в генах: Cu/Zn супероксиддисмутазы, аслина, сенатаксина, династина. Таким образом, моногенные формы связаны с белками, вовлеченными в процесс окислительно-восстановительного стресса и в процессы внутриклеточного транспорта различных белков и органелл. Дополнительно, локусы, сцепленные с БАС, были идентифицированы на хромосомах 15, 16, 18, 20 и Х-хромосоме. Семейные случаи БАС клинически и генетически гетерогенны и могут наследоваться по аутосомно-доминантному, аутосомно-рецессивному и Х-сцеплению (Pasinelli, Brown, 2006). Хотя патофизиология БАС во многом остается неясной, исследования последних лет указывают, что нейромышечные контакты вовлечены в самые ранние стадии заболевания (Dupuis et al., 2009; Liu et al., 2013). Следы дегенерации аксонов с помощью МРТ были обнаружены у пациентов с БАС (Eisen, Weber, 2001; Karlsborg et al., 2004). На модели БАС у мышей (мутация G93A в гене супероксиддисмутазы) была продемонстрирована ретракция моторных аксонов от их мышечных синапсов до появления каких-либо признаков заболевания (Fischer et al., 2004). Аналогичные результаты были получены при анализе биоптатов, полученных у больных на ранних стадиях БАС (Maselli et al., 1993; Fischer et al., 2004). Таким образом, в настоящее время уже можно считать доказанным, что в основе БАС, так же как и на моделях заболевания, лежит потеря контактов в нейромышечных соединениях. Примечательно, что на различных моделях БАС у собак, грызунов и *Drosophila* было отмечено, что прогрессирующая дегенерация нейромышечных синапсов предшествовала дегенерации сомы и аксонов (Balice-Gordon

et al., 2000; Frey et al., 2000; Fischer et al., 2004). В настоящее время предполагается, что дегенерация синапсов при развитии БАС происходит до их удаления с постсинаптической мембраны, и что функциональные нарушения в синапсах предшествуют их коллапсу (Balice-Gordon et al., 2000). Эту гипотезу поддерживают данные, показывающие, что потеря синаптических везикул предшествует структурным изменениям пресинаптической плазматической мембраны (Ikemoto et al., 2002).

7. Возрастные изменения в синапсах

Возрастные изменения характеризуются нарушением когнитивных функций и являются одним из основных факторов риска в развитии НДЗ-заболеваний. Большинство исследователей долгое время предполагало, что старение ассоциировано с уменьшением плотности синапсов в мозге. С использованием антител к синаптофизину было показано, что в процессе нормального старения наблюдается устойчивое снижение концентрации синапсов коры головного мозга, начинающееся по крайней мере в возрасте около двадцати лет (Terry, Katzman, 2001) (рис. 2).

К удивлению, последние данные, полученные на животных, не подтверждают предположения о том, что старение сопровождается потерей синапсов. В недавних экспериментах на мышах было показано, что потери синапсов с возрастом не происходит. Напротив, скорость образования и элиминации синапсов, т.е. обмен синапсов, с возрастом увеличивается в 10–20 раз по сравнению с молодым мозгом (Grillo et al., 2013) (рис. 3).

Эти наблюдения показывают, что обучение и нарушения памяти у мышей с возрастом могут возникать не через неспособность сформировать новые синапсы, а за счет снижения синаптической прочности.

Синаптические нарушения, вызываемые как с мутациями, так и со стрессовыми условиями, представляют собой первичный дефект для широкого спектра невроло-

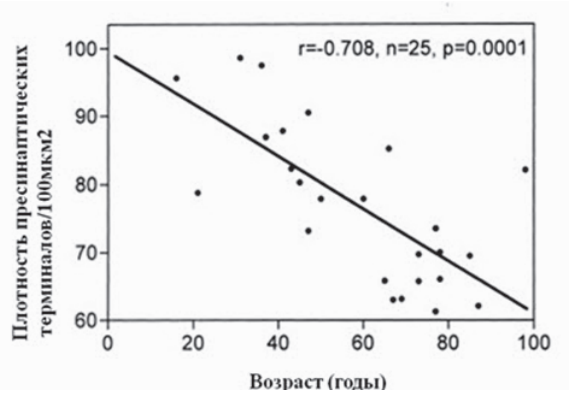


Рис. 2. Плотность синапсов при нормальном старении (Terry, Katzman, 2001)

Плотность пресинаптических терминалов определена методом конфокальной микроскопии на срезах мозга, окрашенных антителами к синаптофизину

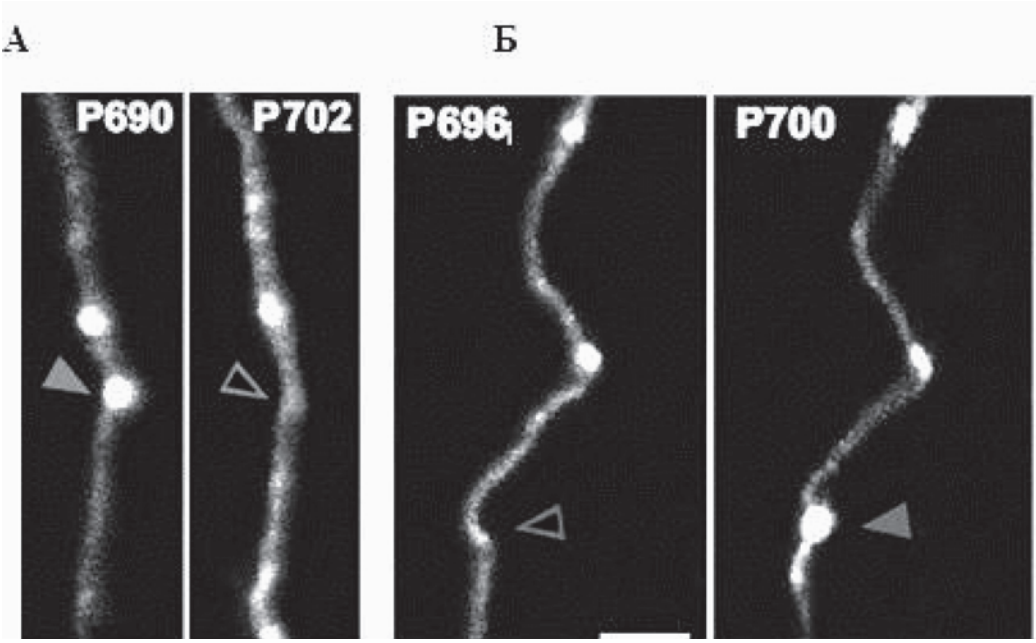


Рис. 3. Изменения в синапсах мышей при старении. Динамика изменения синаптических бутонов в коре головного мозга мышей при старении (Grillo et al., 2013)

А – элиминация бутона. Б – образование бутона. Незакрашенная стрелка указывает место, где находился синаптическмй бутон, закрашенная стрелка – присутствие бутона. Масштаб – 5 мкм

гических заболеваний человека. Обнаружение дисфункции, или потери синапсов позволяет не только проводить раннюю диагностику в период отсутствия клинических симптомов, но и разработать превентивные методы синаптотерапии. Представляется, что исследование моделей НДЗ человека сможет помочь в открытии ключевых клеточных процессов, которые регулируют дисфункцию и дегенерацию синапсов. Понимание этих процессов станет основой для разработки терапии НДЗ.

Литература

Гусев Н.Б. Нейродегенеративные болезни и проблема правильного сворачивания белка // Соросовский образовательный журнал. 2004. Т. 8. № 2. С. 1-23.

Иллариошкин С.Н. Конформационные болезни мозга. М.: Янус-К, 2003. 246 с.

André V.M., Cepeda C., Levine M.S. Dopamine and glutamate in Huntington's disease: A balancing act // CNS Neurosci. Ther. 2010. Vol. 16. P. 163-178.

Aronin, N., Chase, K., Young, C. et al. CAG expansion affects the expression of mutant huntingtin in the Huntington's disease brain // Neuron. 1995. Vol. 15. P. 1193-1201.

Baba M., Nakajo S., Tu P.H. et al. Aggregation of α-synuclein in Lewy bodies of sporadic Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies // Am. J. Pathol. 1998. Vol. 152. P. 879-884.

Bagetta V., Ghiglieri V., Sgobio C. et al. Synaptic dysfunction in Parkinson's disease // Biochem. Soc. Trans. 2010. Vol. 38. P. 493-497.

Balice-Gordon R.J., Smith D.B., Goldman J. et al. Functional motor unit failure precedes neuromuscular degeneration in canine motor neuron disease // Ann. Neurol. 2000. Vol. 47. P. 596-605.

Bate C., Gentleman S., Williams A. α-synuclein induced synapse damage is enhanced by amyloid-β1-42 // Mol. Neurodegener. 2010. Vol. 5. P. 55.
Becher M.W., Kotzuk J.A., Sharp A.H. et al. Intranuclear neuronal inclusions in Huntington's disease and dentatorubral and Pallidoluysian atrophy: correlation between the density of inclusions and IT15 CAG triplet repeat length // Neurobiol. Dis. 1998. Vol. 4. P. 387-397.
Bellani S., Sousa V.L., Ronzitti G. et al. The regulation of synaptic function by alpha-synuclein // Commun.. Integr. Biol. 2010. Vol. 3. P. 106-109.
Belluzzi E., Greggio E., Piccoli G. Presynaptic dysfunction in Parkinson's disease: a focus on LRRK2 // Biochem. Soc. Trans. 2012. Vol. 40. P. 1111-1116.
Bence N.F., Sampat R.M., Kopito R.R. Impairment of the ubiquitinproteasome system by protein aggregation // Science. 2001. Vol. 292. P. 1552-1555.
Berg D., Schweitzer K., Leitner P. et al. Type and frequency of mutations in the LRRK2 gene in familial and sporadic Parkinson's disease // Brain. 2005. Vol. 128. P. 3000-3011.
Bezprozvanny I., Mattson, M.P. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease // Trends. Neurosci. 2008. Vol. 31. P. 454-463.
Boillee S., Vande Velde C., Cleveland D.W. ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors // Neuron. 2006. Vol. 52. P. 39-59.
Bonanomi D., Benfenati F., Valtorta F. Protein sorting in the synaptic vesicle life cycle // Progr. Neurobiol. 2006. V. 80. P. 177-217.
Braak E., Braak H., Mandelkow E.M. A sequence of cytoskeleton changes related to the formation of neurofibrillary tangles and neuropil threads // Acta. Neuropathol. (Berl). 1994. Vol. 87. P. 554-567.
Budka H. Neuropathology of prion diseases // Br. Med. Bull. 2003. Vol. 66. P. 121-130.
Cataldo A.M., Peterhoff C.M, Troncoso J.C. et al. Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations // Am. J. Pathol. 2000. Vol. 157. P. 277-286.
Cha J.H. Transcriptional signatures in Huntington's disease // Prog. Neurobiol. 2007. Vol. 83. P. 228-248.
Chapman P.F., White G.L., Jones M.W. et al. Impaired synaptic plasticity and learning in aged amyloid precursor protein transgenic mice // Nat. Neurosci. 1999. Vol. 2. P. 271-276.
Chartier-Harlin M.C., Kachergus J., Roumier C. et al. Alpha-synuclein locus duplication as a cause of familial Parkinson's disease // Lancet. 2004. Vol. 364. P. 1167-1169.
Cepeda C., Cummings D.M., André V.M. et al. Genetic mouse models of Huntington's disease:focus on electrophysiological mechanisms // ASN Neurol. 2010. Vol. 2. P. e00033.
Citri A., Malenka R.C. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms // Neuropsychopharmacology. 2008. Vol. 33. P. 18-41.
Cleary J.P., Walsh D.M., Hofmeister J.J. et al. Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function // Nat. Neurosci. 2005. Vol. 8. P. 79-84.
Coleman P.D., Yao P.J. Synaptic slaughter in Alzheimer's disease // Neurobiol. Aging. 2003. Vol. 24. P. 1023-1027.
Coleman P., Federoff H., Kurlan R. A focus on the synapse for neuroprotection in Alzheimer disease and other dementias // Neurology. 2004. Vol. 63. P. 1155-1162.
Cunningham C., Deacon R., Wells H. et al. Synaptic changes characterize early behavioural signs in the ME7 model of murine prion disease // Eur. J. Neurosci. 2003. Vol. 17. P. 2147-2155.
Cunningham C., Deacon R.M., Chan K. et al. Neuropathologically distinct prion strains give rise to similar temporal profiles of behavioral deficits // Neurobiol. Dis. 2005. Vol. 18. P. 258-269.
Davidsson P., Blennow K. Neurochemical dissection of synaptic pathology in Alzheimer's disease // Int. Psychogeriatr. 1998. V. 10. P. 11-23.
Davies C.A., Mann D.M., Sumpter P.Q., Yates P.O. A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease // J. Neurol. Sci. 1987. Vol. 78. P. 151-164.
Davis K.L., Samuels S.C. Dementia and delirium // Pharmacological Management of Neurological and Psychiatric Disorders. NY: McGraw-Hill, 1998. P. 267-316.
Dawson T.M., Dawson V.L. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease // Science. 2003. Vol. 302. P. 819-822.

Dawson T.M., Ko H.S., Dawson V.L. Genetic animal models of Parkinson's disease // Neuron. 2010. Vol. 66. P. 646-661.

DeKosky S.T., Scheff S.W. Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: correlation with cognitive severity // Ann. Neurol. 1990. Vol. 27. P. 457-464.

DeKosky S.T, Scheff S.W, Styren S.D. Structural correlates of cognition in dementia: quantification and assessment of synapse change // Neurodegeneration. 1996. Vol. 5. P. 417-421.

DiFiglia M., Sapp E., Chase K.O. et al. Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain // Science. 1997. Vol. 277. P. 1990-1993.

Diógenes M.J., Dias R.B., Rombo D.M.et al. Extracellular alpha-synuclein oligomers modulate synaptic transmission and impair LTP via NMDA-receptor activation // J. Neurosci. 2012. Vol. 32. P. 11750-11762.

Dodart J.C., Bales K.R., Gannon K.S. et al. Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model // Nat. Neurosci. 2002. Vol. 5. P. 452-457.

Dunah A.W., Jeong H., Griffin A. et al. Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease // Science. 2002. Vol. 296. P. 2238-2243.

Dupuis L., Gonzalez de Aguilar J.L. et al. Muscle mitochondrial uncoupling dismantles neuromuscular junction and triggers distal degeneration of motor neurons // PLoS One. 2009. Vol. 4. P. e 5390.

Eisen A., Weber M. The motor cortex and amyotrophic lateral sclerosis // Muscle Nerve. 2001. Vol. 24. P. 564-573.

Elias M.F, Beiser A., Wolf P.A. et al. The preclinical phase of Alzheimer disease: a 22-year prospective study of the Framingham Cohort // Arch. Neurol. 2000. Vol. 57. P. 808-813.

Enya M., Morishima-Kawashima M., Yoshimura M. et al. Appearance of sodium dodecyl sulfate-stable amyloid beta-protein (Abeta) dimer in the cortex during aging // Am. J. Pathol. 1999. Vol. 154. P. 271-279.

Fischer L.R., Culver D.G., Tennant P. et al. Amyotrophic lateral sclerosis is a distal axonopathy: evidence in mice and man // Exp. Neurol. 2004. Vol. 185. P. 232-240.

Fortin D.L., Nemani V.M., Voglmaier S.M. et al. Neural activity controls the synaptic accumulation of alpha-synuclein // J. Neurosci. 2005. Vol. 25. P. 10913-10921.

Frey D., Schneider C., Xu L. et al. Early and selective loss of neuromuscular synapse subtypes with low sprouting competence in motor neuron diseases // J. Neurosci. 2000. Vol. 20. P. 2534-2542.

Gillingwater T.H, Ribchester R.R. Compartmental neurodegeneration and synapticplasticity in the Wlds mutant mouse // J. Physiol. 2001. Vol. 534. P. 627-639.

Gilman C.P., Mattson M.P. Do apoptotic mechanisms regulate synaptic plasticity and growth-cone motility? // Neurol. Molecular. Med. 2002. Vol. 2. P. 197-214.

Gong Y., Chang L., Viola K.L. et al. Alzheimer's disease-affected brain: presence of oligomeric A beta ligands (ADDLs) suggests a molecular basis for reversible memory loss // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. Vol. 100. P. 10417-1042.

Grillo F.W., Song S., Teles-Grilo Ruivo L.M. et al. Increased axonal bouton dynamics in the aging mouse cortex // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. Vol. 110. P. E1514-23.

Guidetti P., Charles V., Chen E.Y. et al. Early degenerative changes in transgenic mice expressing mutant huntingtin involve dendritic abnormalities but no impairment of mitochondrial en early degenerative changes in transgenic mice ergy production // Exp. Neurol. 2001. Vol. 169. P. 340-350.

Guenther K., Deacon R.M., Perry V.H., Rawlins J.N. Early behavioral changes in scrapie-affected mice and the influence of dapsone // Eur. J. Neurosci. 2001. Vol. 14. P. 401-409.

Hatanpaa K., Isaacs K.R, Shirao T. et al. Loss of proteins regulating synaptic plasticity in normal aging of the human brain and in Alzheimer disease // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1999. Vol. 58. P. 637-643.

Hedrich K., Djarmati A., Schafer N. et al. DJ-1 (PARK7) mutations are less frequent than Parkin (PARK2) mutations in early-onset Parkinson disease // Neurology. 2004. Vol. 62. P. 389-394.

Helton T.D., Otsuka T., Lee M.C. et al. Pruning and loss of excitatory synapses by the parkin ubiquitin ligase // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. Vol. 105. P. 19492-19497.

Hilton D.A., *Ghani A.C., Conyers L. et al.* Accumulation of prion protein in tonsil and appendix: review of tissue samples // BMJ. 2002. Vol. 325. P. 633-634.

Huynh D.P., Zhang D.P., Scoles D.R. et al. The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI // Hum. Mol. Genet. 2003. Vol. 12. P. 2587-2597.

Ikemoto A., Nakamura S., Akiguchi I., Hirano A. Differential expression between synaptic vesicle proteins and presynaptic plasma membrane proteins in the anterior horn of amyotrophic lateral sclerosis // Acta. Neuropathol. 2002. Vol. 103. P. 179-187.

Ishikura N., Clever J.L., Bouzamondo-Bernstein E. et al. Notch-1 activation and dendritic atrophy in prion disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. Vol. 102. P. 886-891.

Jeffrey M., Halliday W.G., Bell J. et al. Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus // Neuropathol. Appl. Neurobiol. 2000. Vol. 26. P. 41-54.

Johnston A.R., Black C., Fraser J., MacLeod N. Scrapie infection alters the membrane and synaptic properties of mouse hippocampal CA1 pyramidal neurons // J. Physiol. (Lond). 1997. Vol. 500. P. 1-15.

Karlsborg M., Rosenbaum S., Wiegell M. et al. Corticospinal tract degeneration and possible pathogenesis in ALS evaluated by MR diffusion tensor imaging // Amyotroph. Lateral Scler. Other Motor Neuron. Disord. 2004. Vol. 5. P. 136-140.

Kawas C.H., Corrada M.M., Brookmeyer R. et al. Visual memory predicts Alzheimer's disease more than a decade before diagnosis // Neurology. 2003. Vol. 60. P. 1089-1093.

Kitada T., Pisani A., Porter D.R. et al. Impaired dopamine release and synaptic plasticity in the striatum of PINK1-deficient mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. Vol. 104. P. 11441-11446.

Klein C., Grunewald A., Hedrich K. Early-onset parkinsonism associated with PINK1 mutations: frequency, genotypes, and phenotypes // Neurology. 2006. Vol. 66. P. 1129-1130.

Klyubin I., Walsh D.M., Lemere C.A. et al. Amyloid beta protein immunotherapy neutralizes Abeta oligomers that disrupt synaptic plasticity in vivo // Nat. Med. 2005. Vol. 11. P. 556-561.

Kotilinek L.A., Bacskai B., Westerman M. et al. Reversible memory loss in a mousetransgenic model of Alzheimer's disease // J. Neurosci. 2002. Vol. 22. P. 6331-6335.

Kretzschmar H.A., Prusiner S.B., Stowring L.E., DeArmond S.J. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons // Am. J. Pathol. 1986. Vol. 122. P. 1-5.

Kruger R., Kuhn W., Muller T. et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease // Nat. Genet. 1998. Vol. 18. P. 106-108.

Kuhn A., Goldstein D.R, Hodges A. et al. Mutant huntingtin's effects on striatal gene expression in mice recapitulate changes observed in human Huntington's disease brain and do not differ with mutant huntingtin length or wild-type huntingtin dosage // Hum. Mol. Genet. 2007. Vol. 16. P. 1845-1860.

Kullmann D.M., Lamsa K.P. Long-term synaptic plasticity in hippocampal interneurons // Nat. Rev. Neurosci. 2007. Vol. 8. P. 687-699.

Lambert M.P., Barlow, A.K., Chromy B.A. et al. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. P. 6448-6453.

Landis D.M., Williams R.S., Masters C.L. Golgi and electronmicroscopic studies of spongiform encephalopathy // Neurology. 1981. Vol. 31. P. 538-549.

Landles C., Bates G.P. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease. Fourth in molecular medicine review series // EMBO Rep. 2004. Vol. 5. P. 958-963.

Lawrence A.D., Hodges J.R., Rosser A.E.et al. Evidence for specific cognitive deficits in preclinical Huntington's disease // Brain. 1998. Vol. 121. P. 1329 -1341.

Lee S., Liu H.P., Lin W.Y. et al. LRRK2 kinase regulates synaptic morphology through distinct substrates at the presynaptic and postsynaptic compartments of the Drosophila neuromuscular junction // J. Neurosci. 2010. Vol. 30. P. 16959-16969.

Legname G., Baskakov I.V., Nguyen H.O. et al. Synthetic mammalian prions // Science. 2004. Vol. 305. P. 673-676.

Li H., Li S.H., Yu Z.X. et al. Huntingtin aggregateassociated axonal degeneration is an early pathological event in Huntington's disease mice // J. Neurosci. 2001. Vol. 21. P. 8473-8481.

Li H., Wyman T., Yu Z.X. Abnormal association of mutant huntingtin with synaptic vesicles inhibits glutamate release // Hum. Mol. Genet. 2003. Vol. 12. P. 2021-2030.

Li J.Y., Plomann M., Brundin P. Huntington's disease: a synaptopathy? // Trends. Mol. Med. 2003. Vol. 9. P. 414-420.

Liu J-X., Brannstrom T., Andersen P.M., Pedrosa-Domellof F. Distinct changes in synaptic protein composition at neuromuscular junctions of extraocular muscles versus limb muscles of ALS donors // PLoS One. 2013. Vol. 8. P. e57473.

Liu L., Wong T.P., Pozza M.F. et al. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity // Science. 2004. Vol. 304. P. 1021-1024.
Lotharius J., Barg S., Wiekop P. et al. Effect of mutant alpha-synuclein on dopamine homeostasis in a new human mesencephalic cell line // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. P**.** 38884-38894.
Mallucci G.R. Prion neurodegeneration: starts and stops at the synapse // Prion. 2009. Vol. 3. P. 195-201.
Mallucci G., Dickinson A., Linehan J. et al. Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis // Science. 2003. Vol. 302. P. 871-874.
Mallucci G.R., White M.D., Farmer M. et al. Targeting cellular prion protein reverses early cognitive deficits and neurophysiological dysfunction in prion-infected mice // Neuron. 2007. Vol. 53. P. 325-335.
Maselli R.A., Wollman R.L., Leung C. et al. Neuromuscular transmission in amyotrophic lateral sclerosis // Muscle Nerve. 1993. Vol. 16. P. 1193-1203.
Masliah E., Mallory M., Alford M. et al. Altered expression of synaptic proteins occurs early during progression of Alzheimer's disease // Neurology. 2001. Vol. 56. P. 127-129.
Masliah E., Terry R. The role of synaptic proteins in the pathogenesis of disorders of the central nervous system // Brain. Pathol. 1993. Vol. 3. P. 77-85.
Matta S., Van Kolen K., da Cunha R. et al. LRRK2 controls an EndoA phosphorylation cycle in synaptic endocytosis // Neuron. 2012. Vol. 75. P. 1008-1021.
Mattson M.P., Keller J.N., Begley J.G. Evidence for synaptic apoptosis // Exp. Neurol. 1998. Vol. 153.P. 35.
Mattson M.P. Apoptotic and anti-apoptotic synaptic signaling mechanisms // Brain. Pathol. 2000. Vol. 10. P. 300-312.
Milnerwood A.J., Raymond L.A. Early synaptic pathophysiology in neurodegeneration: insights from Huntington's disease // Trends Neurosci. 2010. Vol. 33. P. 513-523.
Mizuno H., Shibayama H., Tanaka F.et al. An autopsy case with clinically and molecular genetically diagnosed Huntington's disease with only minimal nonspecific neuropathological findings // Clin. Neuropathol. 2000. Vol. 19. P. 94-103.
Moser M., Colello R.J., Pott U., Oesch B. Developmental expression of the prion protein gene in glial cells // Neuron. 1995. Vol. 14. P. 509-517.
Mucke L., Masliah E., Yu G.Q. et al. High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation // J. Neurosci. 2000. Vol. 20. P. 4050-4058.
Murthy V.N., De Camilli P. Cell biology of the presynaptic terminal // Annu. Rev. Neurosci. 2003. Vol. 26. P. 701-728.
Nucifora F.C. Jr, Ellerby L.M., Wellington C.L. et al. Nuclear localization of a non-caspase truncation product of atrophin-1, with an expanded polyglutamine repeat, increases cellular toxicity // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. P. 13047-13055.
Nuytemans K., Theuns J., Cruts M., Van Broeckhoven C. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update // Hum. Mutat. 2010. Vol. 31. P. 763-780.
O'Hare E., Weldon D.T., Mantyh P.W. et al. Delayed behavioral effects following intrahippocampal injection of aggregated A beta (1-42) // Brain Res. 1999. Vol. 815. P. 1-10.
Paisan-Ruíz C., Jain S., Evans E.W. et al. Cloning of the gene containing mutations that cause PARK8-linked Parkinson's disease // Neuron. 2004. Vol. 44. P. 595-600.
Palop J.J., Mucke L. Amyloid-beta-induced neuronal dysfunction in Alzheimer's disease: from synapses toward neural networks // Nat. Neurosci. 2010. Vol. 13. P. 812-818.
Pasinelli P., Brown R.H. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics // Nat. Rev. Neurosci. 2006. Vol. 7. P. 710-723.
Paulsen J.S., Langbehn D.R., Stout J.C.et al. Detection of Huntington's disease decades before diagnosis: the Predict-HD study // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2008. Vol. 79. P. 874-880.
Piccoli G., Condliffe S.B., Bauer M. et al. LRRK2 controls synaptic vesicle storage and mobilization within the recycling pool // J. Neurosci. 2011. Vol. 31. P. 2225-2237.
Picconi B., Piccoli G., Calabresi P. Synaptic dysfunction in Parkinson's disease // Adv. Exp. Med. Biol. 2012. Vol. 970. P. 553-72.
Plowey E.D., Chu C.T. Synaptic dysfunction in genetic models of Parkinson's disease: a role for autophagy? // Neurobiol. Dis. 2011. Vol. 43. P. 60-67.

Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E. et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease // Science. 1997. Vol. 276. P. 2045-2047.
Popugaeva E., Supnet C., Bezprozvanny I. Presenilins, deranged calcium homeostasis, synaptic loss and dysfunction in Alzheimer's disease // Messenger. 2007. Vol. 1. P. 53-62.
Prusiner S.B., *McKinley M.P., Bowman K.A.* Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods // Cell. 1983. Vol. 35. P. 349-358.
Prusiner S.B. Prions // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. P. 13363-13383.
Puzzo D., Privitera L., Leznik E. et al. Picomolar Amyloid-{beta} Positively Modulates Synaptic Plasticity and Memory in Hippocampus // J. Neurosci. 2008. Vol. 28. P. 14537-14545.
Raymond L.A., André V.M., Cepeda C. et al. Pathophysiology of Huntington's disease: time-dependent alterations in synaptic and reeptor function // Neuroscience. 2011. Vol. 198. P. 252-273.
Recchia A., Debetto, P., Negro, A. et al. Alpha-Synuclein and Parkinson's disease // FASEB J. 2004. Vol. 18. P. 617-626.
Rowland L.P., Shneider N.A. Medical progress: Amyotrophic lateral sclerosis // N. Engl. J. Med. 2001. Vol. 344. P. 1688-1700.
Saura C.A., Choi S.-Y., Beglopoulos V. et al. Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration // Neuron. 2004. Vol. 42. P. 23-36.
Savitt J.M., Dawson V.L., Dawson T.M. Diagnosis and treatment of Parkinson disease: molecules to medicine // J. Clin. Invest. 2006. Vol. 116. P. 1744-1754.
Scheff S.W., Price D.A., Schmitt F.A. et al. Synaptic alterations in CA1 in mild Alzheimer disease and mild cognitive impairment // Neurology. 2007. Vol. 68. P. 1501-1508.
Scott D.A., Tabarean I., Tang Y. et al. A pathologic cascade leading to synaptic dysfunction in alpha-synuclein-induced neurodegeneration // J. Neurosci. 2010. Vol. 30. P. 8083-8095.
Selkoe D. Alzheimer's disease is a synaptic failure // Science. 2002. Vol. 298. P. 789-791.
Shankar G.M., Bloodgood B.L., Townsend M. et al. Natural oligomers of the Alzheimer amyloid-beta protein induce reversible synapse loss by modulating an NMDA-type glutamate receptor-dependent signaling pathway // J. Neurosci. 2007. Vol. 27. P. 2866-2875.
Shin N., Jeong H., Kwon J. et al. LRRK2 regulates synaptic vesicle endocytosis // Exp. Cell. Res. 2008. Vol. 314. P. 2055-2065.
Sidhu A., Wersinger C., Vernier P. Does alpha-synuclein modulate dopaminergic synaptic content and tone at the synapse? // FASEB J. 2004. Vol. 18. P. 637-647.
Singleton A.B., Farrer M., Johnson J. et al. Alpha-synuclein locus triplication causes Parkinson's disease // Science. 2003. Vol. 302. P. 841.
Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M. et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies // Nature. 1997. Vol. 388. P. 839-840.
Stahl N., Baldwin M.A., Teplow D.B. et al. Structural studies of the scrapie prion protein using mass spectrometry and amino acid sequencing // Biochemistry. 1993. Vol. 32. P. 1991-2002.
Taylor J.P., Mata I.F., Farrer M.J. LRRK2: a common pathway for parkinsonism, pathogenesis and prevention? // Trends Mol. Med. 2006. Vol. 12. P. 76-82.
Terry R.D., Katzman R. Life span and synapses: will there be a primary senile dementia? // Neurobiol. Aging. 2001. Vol. 22. P. 347-348.
Tiraboschi P., Hansen L.A., Alford M. et al. The decline in synapses and cholinergic activity is asynchronous in Alzheimer's disease // Neurology. 2000. Vol. 55. P. 1278-1283.
Thomas B., Beal M.F. Parkinson's disease // Hum. Mol. Genet. 2007. Vol. 16. P. R183-R194.
Tong Y., *Pisani A., Martella G. et al.* R1441C mutation in LRRK2 impairs dopaminergic neurotransmission in mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. Vol. 106. P. 14622-14627.
Townsend M., Shankar G.M., Mehta T. et al. Effects ofsecreted oligomers of amyloid beta-protein on hippocampal synaptic plasticity: a potent role for trimers // J. Physiol. 2006. Vol. 572. P. 477-492.
Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y. Aggregation of neurofilament and alpha-synuclein proteins in Lewy bodies: implications for the pathogenesis of Parkinson disease and Lewy body dementia // Arch. Neurol. 1998. Vol. 55. P. 151-152.
Trottier Y., Devys D., Imbert G. et al. Cellular localization of the Huntington's disease protein and discrimination of the normal and mutated form // Nature Genet. 1995. Vol. 10. P. 104-110.

Tsai J., Grutzendler J., Duff K., Gan W.B. Fibrillar amyloid deposition leads to local synaptic abnormalities and breakage of neuronal branches // Nat. Neurosci. 2004. Vol. 7. P. 1181-1183.

Van Raamsdonk J.M., *Pearson J., Slow E.J. et al.* Cognitive dysfunction precedes neuropathology and motor abnormalities in the YAC128 mouse model of Huntington's disease // J. Neurosci. 2005. Vol. 25. P. 4169-4180.

Venkitaramani D.V., Chin J., Netzer W.J. et al. Beta-amyloid modulation of synaptic transmission andplasticity // J. Neurosci. 2007. Vol. 27. P. 11832-11837.

Vonsattel J.P., Myers R.H., Stevens T.J. et al. Neuropathological classification of Huntington's Disease // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1985. Vol. 44. P. 559-577.

Walsh D.M., Hartley D.M., Kusumoto Y. et al. Amyloid beta-protein fibrillogenesis. Structure and biological activity of protofibrillar intermediates // J. Biol. Chem. 1999. Vol. 274. P. 25945-25952.

Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V. et al. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo // Nature. 2002. Vol. 416. P. 535-539.

Wan O.W., Chung K.K.K. The Role of Alpha-Synuclein oligomerization and aggregation in cellular and animal models of Parkinson's disease // PLoS One. 2012. Vol. 7. e38545.

Wang Y., Chandran J.S., Cai H., Mattson M.P. DJ-1 is essential for long-term depression at hippocampal CA1 synapses // Neuromolecular. Med. 2008. Vol. 10. P. 40-45.

Wishart T.M., Parson S.H., Gillingwater T.H. Synaptic vulnerability in neurodegenerative disease // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2006. Vol. 65. P. 733-739.

Wood J.D., MacMillan J.C., Harper P.S. et al. Partial characterisation of murine huntingtin and apparent variations in the subcellular localisation of huntingtin in human, mouse and rat brain // Hum. Mol. Genet. 1996. Vol. 5. P. 481-487.

Yavich L., Tanila H., Vepsäläinen S., Jäkälä P. Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment // J. Neurosci. 2004. Vol. 24. P. 11165-70.

Zarranz J.J., Alegre J., Gomez-Esteban J.C. et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia // Ann. Neurol. 2004. Vol. 55. P. 164-173.

Zeron M.M., Hansson O., Chen N. Increased sensitivity to N-methyl-Daspartate receptor-mediated excitotoxicity in a mouse model of Huntington's disease // Neuron. 2002. Vol. 33. P. 849-860.

Zhang Y., Gao J., Chung K.K. et al. Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 13354-13359.

Zimprich A., Mu¨ller-Myhsok B., Farrer M. et al. The PARK8 locus in autosomal dominant parkinsonism: confirmation of linkage and further delineation of the disease-containing interval // Am. J. Hum. Genet. 2004. Vol. 74. P.11-19.

Дисфункция периферических возбудимых структур при нейродегенеративных заболеваниях

М.А. Мухамедьяров, П.Н. Григорьев, А.В. Леушина, А.А. Ризванов, А.В. Мартынов, Р.Р. Исламов, А.Л. Зефиров

Содержание

1. Введение
2. β-амилоид и периферические нарушения: вклад в нейродегенеративный процесс
3. Нарушение нервно-мышечной синаптической передачи в моделях НДЗ
4. Сердечно-сосудистая система и болезнь Альцгеймера: клинические данные
5. Патология сердца при боковом амиотрофическом склерозе
6. Дисфункция сердечно-сосудистой системы при болезни Хантингтона
7. Заключение

1. Введение

Нейродегенеративные заболевания (НДЗ) представляют собой гетерогенную группу хронических фатальных заболеваний нервной системы, которые характеризуются прогрессирующей гибелью нейронов мозга. Наиболее распространенными и тяжелыми НДЗ являются болезнь Альцгеймера (БА), болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз (БАС). В настоящее время во всем мире насчитывается более 45 миллионов людей, преимущественно пожилого возраста, страдающих от различных НДЗ, что делает их важнейшей медико-социальной проблемой общества. Различные НДЗ характеризуются гибелью нейронов в специфических областях головного или спинного мозга, проявляются в виде множественных когнитивных и/или двигательных нарушений (в зависимости от нозологии), быстро приводят к инвалидизации, а затем к смерти больного. Так, при болезни Альцгеймера смерть наступает в среднем через 8 лет, а при боковом амиотрофическом склерозе – в среднем через 5 лет после постановки диагноза. К сожалению, до сих пор медицина не располагает эффективными средствами для лечения НДЗ. Большинство применяемых препаратов действуют симптоматически, не влияя на причину заболевания – гибель нейронов. Кроме того, в настоящее время НДЗ диагностируются уже на этапе декомпенсации, когда большинство заинтересованной популяции нейронов уже погибла, а значит повлиять на ход болезни практически невозможно (Угрюмов, 2010). Основной причиной НДЗ является гибель нейронов

Сокращения: βАП – β-амилоидный пептид; БА – болезнь Альцгеймера; БАС – боковой амиотрофический склероз; БПА – белок предшественник амилоида; БХ – болезнь Хантингтона; ВРС – вариабельность ритма сердца; МРТ – магнитно-резонансная томография; НДЗ – нейродегенеративные заболевания; НО – нервное окончание; ФП – фибрилляция предсердий.

под действием разнообразных патогенетических факторов, таких как накопление токсических белковых агрегатов, окислительный стресс, митохондриальная дисфункция, внутриклеточный кальциевый дисбаланс и др. (Мухамедьяров, Зефиров, 2013). В последнее время появились данные о том, что определенную роль в патогенезе многих НДЗ играет дисфункция возбудимых клеток периферических органов, относящихся к нервно-мышечной и сердечно-сосудистой системе.

В настоящее время существует необходимость поиска новых, патогенетических подходов к лечению НДЗ с использованием новейших достижений медико-биологических наук. Большое значение в данной области имеет ранняя диагностика НДЗ. Большой интерес для диагностики НДЗ представляет поиск специфических маркеров болезни в периферических тканях, однако пока ни одного подобного метода не внедрено в клиническую практику.

Важное значение в патогенезе НДЗ имеют периферические нарушения нервно-мышечной и сердечно-сосудистых систем, которые зачастую и становятся непосредственными причинами инвалидизации и смерти. К ним можно отнести атрофию и паралич скелетных мышц, инфаркт миокарда и т.д. Необходимо понимать, что патология нервно-мышечной и сердечно-сосудистой систем при НДЗ не является просто «отражением» дегенеративных изменений в нервной системе, а представляет собой отдельный, практически неизученный аспект патогенеза НДЗ, значение которого в практической медицине недооценивается. Периферические дисфункции при НДЗ могут быть первичными, либо усиливающими дегенеративный процесс в центральной нервной системе, что еще повышает их значимость в клиническом течении заболевания.

В рамках данного обзора будут рассмотрены клеточно-молекулярные механизмы дисфункции возбудимых структур (синапсы и мышечные клетки) в периферических органах, относящихся к нервно-мышечной и сердечно-сосудистой системам. Акцент будет сделан на вне-нейрональной патологии при болезни Альцгеймера, но также затронуты и другие нейродегенеративные заболевания – боковой амиотрофический склероз, болезнь Хантингтона.

2. β-амилоид и периферические нарушения: вклад в нейродегенеративный процесс

β-амилоидный пептид (βАП) является олигопептидом, состоящим из 38–42 аминокислотных остатков, который образуется во внеклеточном пространстве при расщеплении трансмембранного белка предшественника амилоида (БПА) под действием специальных ферментов – β- и γ-секретаз (Crouch et al., 2008; Querfurth, LaFerla, 2010). Считается, что избыточная продукция и накопление нейротоксического βАП лежат в основе патогенеза БА. βАП полимеризуется с образованием длинных нерастворимых фибрилл, которые являются ключевым компонентом сенильных бляшек, формирующихся в мозге и некоторых других тканях у пациентов с болезнью Альцгеймера, а также у трансгенных мышей с генетической моделью этого недуга (Crouch et al., 2008; Querfurth, LaFerla, 2010). Одним из перспектив-

ных методов ранней диагностики БА может являться определение различных форм βАП либо их соотношений в крови и периферических тканях (кожа, мышцы). Однако при наличии большого количества исследований, посвященных изучению токсических эффектов βАП, остается много неясных вопросов относительно механизмов участия βАП в развитии НДЗ, что тормозит разработку способов диагностики с применением количественной оценки βАП.

В последнее время значительное внимание исследователей привлекают возможные токсические эффекты βАП на не-нейрональные клетки. О возможности периферического токсического воздействия βАП свидетельствуют ряд фактов. Во-первых, БПА экспрессируется не только в нейронах, но и практически во всех клеточных типах организма (Selkoe et al., 1988), а растворимый βАП присутствует в системном кровотоке (Mehta et al., 2000). Кроме того, отложения βАП обнаружены не только в мозге, но и в коже и скелетных мышцах пациентов с болезнью Альцгеймера (Joachim et al., 1989; Soininen et al., 1992). Наконец, при БА наблюдается повышенная частота встречаемости двигательных и сердечно-сосудистых нарушений (Rosendorff et al., 2007; Wirths, Bayer, 2008). С учетом приведенных фактов наиболее вероятными мишенями периферического токсического воздействия βАП являются возбудимые клетки двигательного аппарата и сердечно-сосудистой системы. Вместе с тем, эти эффекты изучены гораздо меньше, чем воздействие βАП на нейроны.

Значительный интерес представляет исследование токсических эффектов βАП на возбудимые структуры двигательного аппарата. Интересно, что при БА помимо выраженной когнитивной дисфункции иногда (особенно на поздних стадиях болезни) наблюдаются легкие либо умеренные моторные нарушения: брадикинезия, тремор, дизартрия, ригидность и др. (Goldman et al., 1999; Wirths, Bayer, 2008). У пациентов с болезнью Альцгеймера также отмечается снижение веса за счет уменьшения мышечной массы, что может косвенно свидетельствовать о дегенеративных процессах в мышцах (Poehlman, Dvorak, 2000). Наконец, ярким примером токсического воздействия βАП на скелетные мышцы может служить миозит с включениями – распространенное мышечное заболевание, характеризующееся слабостью и атрофией мышц конечностей (Kitazawa et al., 2006). В основе патогенеза миозита с включениями лежит внутриклеточное накопление βАП в мышечных волокнах.

В исследовании на портняжной мышце лягушки и диафрагме мыши мы установили, что под действием βАП (фрагмент 25–35) происходит снижение амплитуды потенциалов концевой пластинки вследствие уменьшения величины мембранного потенциала покоя мышечных волокон (Mukhamedyarov et al., 2009). В результате этого нарушается сократимость мышцы лягушки, но не мыши, что может объясняться более высоким фактором надежности нервно-мышечной передачи у теплокровных (Mukhamedyarov et al., 2011). В электрофизиологических экспериментах на диафрагме мыши мы установили, что βАП нарушает процессы генерации мембранного потенциала покоя и вызывает выраженную деполяризацию мышечных волокон за счет двух механизмов: 1) ингибирование Na^+/K^+-АТФазы, что приводит к исчезновению вклада данного насоса в формирование мембранного потенциала покоя; 2) увеличение катионной проницаемости мембраны в результате формиро-

вания в ней «амилоидных» каналов, блокируемых ионами Zn (Мухамедьяров и др., 2011).

При обсуждении экспериментальных данных необходимо учитывать, что у пациентов с болезнью Альцгеймера выраженные двигательные и мышечные нарушения встречаются довольно редко. Тогда возникает закономерный вопрос – какова же клиническая значимость обнаруженных нами эффектов βАП в функциях скелетных мышечных волокон?

Необходимо отметить, что использованная нами в экспериментах концентрация βАП в несколько раз ниже той, что обнаруживается в плазме крови пациентов с болезнью Альцгеймера (Mehta et al., 2000). Кроме того, *in vivo* могут наблюдаться защитные реакции организма от действия βАП в виде иммунного ответа и активности βАП-деградирующих ферментов (Caccamo et al., 2005; Crouch et al., 2008). С другой стороны, при БА мышца подвергается воздействию βАП в течение гораздо более длительного времени (годы и десятилетия). Кроме того, эффекты βАП могут сильнее проявляться при двигательной нагрузке, когда высокочастотная активация нервно-мышечного синапса приводит к депрессии потенциалов концевой пластинки и снижению фактора надежности нервно-мышечной передачи. При этом на поздних стадиях БА пациенты практически прикованы к постели вследствие ухудшения общего состояния, что может маскировать мышечную патологию.

Кстати, патологические изменения мышц при миозите с включениями могут во многом объясняться воздействием βАП на процессы мембранного электрогенеза, обнаруженным в наших исследованиях. В целом, полученные нами данные значительно расширяют понимание механизмов развития двигательных нарушений и патологии скелетных мышц при БА, миозите с включениями и других заболеваниях, связанных с накоплением βАП.

Существует определенная взаимосвязь между нарушением метаболизма βАП и патологией сердечно-сосудистой системы. Сердечно-сосудистыми факторами риска развития БА являются инсульты, артериальная гипертензия, диабет, гиперхолестеринемия, сердечная недостаточность, фибрилляция предсердий и др. (De Toledo Ferraz Alves et al., 2010; Dolan et al., 2010). Повышенный риск развития атеросклероза в среднем возрасте приводит к повышению риска развития БА в старости (Skoog et al., 1996). В наших исследованиях показано, что кардиохирургические вмешательства вызывают синдром, сходный с болезнью Альцгеймера, который проявляется снижением когнитивных способностей человека и характерными изменениями биохимического состава ликвора (Palotas et al., 2010; Reis et al., 2011). β-амилоидная ангиопатия сосудов головного мозга является одной из наиболее распространенных патологий в пожилом возрасте, поражая большинство пациентов с болезнью Альцгеймера и около 30% здоровых людей (Love et al., 2009). βАП способен накапливаться в сосудистой стенке в виде нерастворимых фибрилл (Tian et al., 2004), при этом его источником являются нейроны, дегенерирующие миоциты и кровь (Querfurth, LaFerla, 2010). βАП усиливает вазоконстрикцию артериальных сосудов, оказывает токсическое действие на эндотелиальные и гладкомышечные клетки сосудов (Paris et al., 2004; Van Nostrand et al., 1998). Взаимосвязь между болезнью Альцгеймера и сердечно-сосудистой патологией может быть опосре-

дована системой крови – в частности показано, что βАП замедляет растворение фибриновых сгустков путем изменения структуры фибрина и ослабления связывания плазминогена и фибрина (Zamolodchikov, Strickland, 2012). В исследовании на трансгенных мышах с моделью БА обнаружены нарушения сократимости миокарда (Turdi et al., 2009). У крыс с моделью гипертензии, вызванной поперечным сужением аорты, наблюдаются когнитивные нарушения и накопление βАП в ткани мозга (Carnevale et al., 2012).

Несмотря на большое количество экспериментальных данных, механизмы взаимосвязи между нарушением метаболизма βАП и сердечно-сосудистой патологией неясны. Вероятно, взаимосвязь может быть двоякой – с одной стороны, нарушение метаболизма βАП (в первую очередь – при болезни Альцгеймера) может приводить к развитию сердечно-сосудистой патологии. С другой стороны, сердечно-сосудистые нарушения, ведущие к гипоперфузии и гипоксии мозга, способствуют развитию спорадической формы болезни Альцгеймера и нарушению метаболизма βАП. В конечном итоге, болезнь Альцгеймера и сердечно-сосудистая патология взаимоусиливают друг друга, формируя таким образом «порочный круг» патогенеза. Вероятно, поэтому клиницистам бывает довольно сложно провести дифференциальную диагностику между деменцией альцгеймеровского типа и сосудистой деменцией, и довольно часто встречаются смешанные виды деменции.

3. Нарушение нервно-мышечной синаптической передачи в моделях НДЗ

Синапсы составляют основу межклеточной коммуникации в нервной системе. В последние годы установлено, что именно синаптическая передача является «слабым звеном» при развитии патологии нервной системы, и ее нарушения лежат в основе патогенеза целого ряда неврологических и психиатрических заболеваний. В частности, синаптическая патология выявляется практически при всех НДЗ (Garden, La Spada, 2012), причем еще до начала заметной гибели нейронов (Kamenetz et al., 2003; Dupuis, Loeffler, 2009). Дисфункция синапсов играет ключевую роль в развитии болезни Альцгеймера, что послужило причиной считать ее «синаптической болезнью» (Selkoe, 2002). В ряде работ последних лет установлено, что при НДЗ дисфункция развивается не только в центральных, но и в нервно-мышечных синапсах.

Нами была выявлена выраженная синаптическая дисфункция на уровне нервно-мышечного соединения, а также другие нарушения нервно-мышечного аппарата в моделях болезни Альцгеймера и бокового амиотрофического склероза.

Боковой амиотрофический склероз – это НДЗ, которое сопровождается гибелью центральных и периферических мотонейронов, отличается неуклонным прогрессированием и приводит к летальному исходу. Распространенность БАС в мире в среднем составляет 2–5 случаев на 100 тыс. человек в год. При этом в последнее время, отмечены тенденции к росту заболеваемости им во всех возрастных группах. В настоящее время является общепризнанным то, что ключевым фактором

патогенеза гибели нейронов при боковом амиотрофическом склерозе является активация апоптоза.

В электрофизиологических экспериментах на диафрагме трансгенных мышей линии B6SJL-Tg(SOD1-G93A)dl1Gur/J с моделью бокового амиотрофического склероза (БАС) на досимптомной стадии заболевания были обнаружены снижение квантового состава и рост времени нарастания потенциала концевой пластинки, снижение интенсивности загрузки FM 1-43 в НО и ускорение его последующей выгрузки, а также увеличение времени рециклирования синаптических везикул в НО в сравнении с мышами дикого типа. Полученные результаты свидетельствуют о значительном нарушении процессов нейросекреции и рециклирования синаптических везикул в синапсе. Кроме того, у трансгенных мышей с моделью БАС были обнаружены выраженные нарушения электрогенеза скелетной мышцы. При помощи спектрофотометрического метода было установлено, что у G93A-мышей как с симптомной, так и досимптомной стадией БАС концентрация H_2O_2, одной из ключевых активных форм кислорода, в головном, спинном мозге и исследованной скелетной мышце достоверно не отличается от таковой у мышей дикого типа. Полученные данные расширяют понимание патогенетических механизмов БАС и других нейродегенеративных заболеваний.

В экспериментальных исследованиях было выявлено, что в двух моделях БА на животных (β-амилоидная модель и трансгенные мыши линии B6C3-Tg(APP695)85Dbo Tg(PSENI)85Dbo) происходит нарушение функций периферических возбудимых структур нервно-мышечной системы. Было установлено, что в β-амилоидной и генетической моделях БА происходит выраженное нарушение функции нервно-мышечного синапса, одним из ключевых механизмов при этом является нарушение параметров рециклирования синаптических везикул в двигательном нервном окончании. В двух моделях БА также происходит нарушение электрогенеза скелетных мышечных волокон, проявляющееся в виде снижения величины мембранного потенциала покоя. Однако механизм нарушений электрогенеза различен – в β-амилоидной модели (острая модель) происходит выраженное угнетение работы натрий-калиевого насоса и увеличение проницаемости мембраны мышечного волокна для катионов за счет формирования катион-селективных «амилоидных» каналов в плазматической мембране мышечных волокон, а в генетической модели БА (хроническая модель) наблюдается снижение активности и переход на иной (более низкий) стационарный уровень работы Na^+/K^+-АТФазы и, возможно, других ионных насосов мембраны мышечных волокон (Мухамедьяров и др., 2011; Mukhamedyarov et al., 2014). Одним из возможных механизмов нарушения функций скелетных мышечных волокон может быть увеличение продукции активных форм кислорода, в частности перекиси водорода, в данных клетках, что было показано в ходе выполнения исследований.

Есть данные о дисфункции нервно-мышечного синапса в модели болезни Хантингтона – НДЗ, характеризующегося постепенным началом в возрасте 35–50 лет и сочетанием прогрессирующего хореического гиперкинеза и психических расстройств. В модели болезни Хантингтона на R6/1-трансгенных мышах выявлено увеличение амплитуды и квантового состава потенциалов концевой пластинки при

неизменных параметрах спонтанной нейросекреции и отстутствии нарушений в размере и динамике рециклирующего пула синаптических везикул. Кроме того, было обнаружено увеличение экспрессии нескольких синаптических белков, в частности VAMP/синаптобревина и SNAP-25 (Rozas et al., 2011).

4. Сердечно-сосудистая система и болезнь Альцгеймера: клинические данные

Исследования последних лет свидетельствуют о том, что существует взаимосвязь между болезнью Альцгеймера и патологией сердечно-сосудистой системы. Факторами риска развития болезни Альцгеймера являются инсульт, артериальная гипертензия, диабет, гиперхолестеринемия, сердечная недостаточность, фибрилляция предсердий и др. (De Toledo Ferraz Alves et al., 2010; Dolan et al., 2010). Повышенный риск развития атеросклероза в среднем возрасте приводит к повышению риска развития болезни Альцгеймера в старости (Skoog et al., 1996). В наших исследованиях показано, что кардиохирургические вмешательства вызывают синдром, сходный с болезнью Альцгеймера, который проявляется снижением когнитивных способностей человека и характерными изменениями биохимического состава ликвора (Palotas et al., 2010; Reis et al., 2011).

Недавно была сделана попытка определения возможной взаимосвязи между фибрилляцией предсердий (ФП) и деменцией, а также решения вопроса – является ли их совместное наличие независимым маркером риска (Bunch et al., 2010). В общей сложности были проанализированы данные 37 025 пациентов из крупного проспективного исследования Intermountain Heart Collaborative Study, которые находились под наблюдением специалистов в среднем в течение 5 лет (как для пациентов с ФП, так и с деменцией). Деменция была подразделена на сосудистую, старческую, при БА и неспецифическую. Авторы установили, что ФП была независимо связана со всеми вышеуказанными формами деменции, при этом наличие ФП у пациентов с выявленной деменцией указывает на высокий риск смерти.

Тем не менее, согласно работе (Jefferson et al., 2010), сердечная дисфункция взаимосвязана с нейроанатомическими и нейропсихическими изменениями при старении пациентов, у которых преобладают сердечно-сосудистые заболевания. Считается, что это происходит из-за того, что системная гипоперфузия нарушает перфузию головного мозга, способствуя его субклиническому повреждению. Сделано предположение, что оценка функции сердца при помощи сердечного индекса будет взаимосвязана с доклиническим исследованием головного мозга при помощи магнитно-резонансной томографии (МРТ), нейропсихологическими маркерами ишемии и БА. Анализ данных МРТ головного мозга, сердца, нейропсихологических и лабораторных исследований 1504 участников исследования Framingham Offspring, у которых не было инсультов, транзиторных ишемических атак или деменции (возраст 61±9 лет, 54% женщин), выявил, что результаты нейропсихологических исследований и МРТ головного мозга были взаимосвязаны с сердечным

индексом (сердечный выброс/площадь поверхности тела), полученным при МРТ. В многофакторных моделях сердечный индекс был положительно взаимосвязан с общим объемом мозга (p=0,03) и обратно взаимосвязан с объемом боковых желудочков (p=0,048). Хотя авторам не удалось установить причину, вызывающую вышеупомянутую корреляционную взаимосвязь, полученные данные согласуются с гипотезой о снижении функции сердца даже при нормальной сердечном индексе, связанном с прогрессирующим старением головного мозга.

В 1993 г. была предложена сосудистая гипотеза возникновения БА, которая стала полезной концепцией в определении сосудистых факторов риска БА. Полагают, что для предотвращения, сокращения или задержки начала когнитивных нарушений и деменции влияние этих факторов можно снизить при помощи соответствующего лечения. Среди уже определенных более двух десятков сосудистых факторов риска БА к хроническому снижению перфузии головного мозга при старении могут привести заболевания сердца и атеросклероз сонных артерий. Ведутся клинические исследования по скринингу лиц среднего возраста без когнитивных нарушений с проведением эхокардиографии и ультразвукового исследования сонных артерий для выявления потенциально модифицируемой прогрессирующей патологии. В случае признания эффективности данной методики в профилактике состояний, приводящих к развитию тяжелых когнитивных нарушений, распространенность БА будет возможно значительно уменьшить (Jefferson et al., 2010; De la Torre, 2010).

В дополнение к хорошо известным структурным стигмам, которые сопровождают БА, обращает на себя внимание присутствие группы устойчивых изменений мелких сосудов (капилляров, артериол и венул) – особенно коры головного мозга. Эти изменения включают наросты на сосудах, их мешкообразные расширения неправильной формы, общее утолщение базальной мембраны, потерю мелких периваскулярных нейронных сплетений, которые, как известно, оплетают каждый сосуд, независимо от его размера, и появление приблизительно у половины исследованных пациентов с БА углублений в стенках сосудов. Установлено, что ни одно из этих изменений не было зафиксировано в группе соответствующего возраста без БА (Scheibel et al., 1989).

В экспериментальной работе по изучению гистологии миокарда, сократительной способности кардиомиоцитов и регуляторных белков у диких мышей C57 (WT) и трансгенных моделей БА APPswe/PS1dE9 (APP/PS1) было выявлено, что в миокарде мышей APP/PS1 имелись изменения: снижение пиковой сократимости кардиомиоцитов (выраженный спад при высокой частоте), снижение повторного растяжения (±dL/dt), по сравнению с мышами WT. Во время применения антиоксиданта N-ацетилцистеина контрактильная дисфункция кардиомиоцитов у мышей APP/PS1 снижалась, что, вероятно, говорит о влиянии оксидативного стресса (Turdi et al., 2009).

5. Патология сердца при боковом амиотрофическом склерозе

В работе (Gdynia et al., 2006) указывается, что повреждение миокарда при мотонейронных заболеваниях крайне редки. Однако среди обследованных авторами

четырех пациентов с подтвержденным БАС и двух больных с наследственной спастической параплегией была выявлена кардиомиопатия. За исключением одного случая гиперлипидемии и умеренной гипертензии, ни у одного из этих больных не было сердечно-сосудистых факторов риска. Также не было выявлено условий для развития вторичной кардиомиопатии.

Общеизвестно, что при БАС обычно поражаются мотонейроны, однако накопленные доказательства говорят о вовлечении в патологический процесс симпатических нейронов, так же как и при других заболеваниях, включая деменцию с тельцами Леви, болезнь Паркинсона и множественную системную атрофию. При этих заболеваниях возрастает риск внезапной остановки сердца, в то время как при БАС этот аспект остается неизученным. Были исследованы 12 спорадических случаев БАС у больных без искусственной вентиляции легких. Среди них двое больных скончались от внезапной остановки сердца. Изменения интервала QT, его дисперсия, указывающие на симпатическую активность, были получены при помощи ЭКГ, оценены на ранней и терминальной стадии заболевания. Было исследовано промежуточно-латеральное ядро (ПЯ) симпатических нервов в верхнем (грудном) отделе спинного мозга. QT-интервал и его дисперсия значительно увеличились в терминальную стадию по сравнению с начальной. Количество нейронов ПЯ было значительно ниже у больных с БАС по сравнению с контрольной группой (p=0,017) и имело обратную линейную корреляцию со степенью увеличения максимального QT-интервала и дисперсии QT. Больные с БАС имеют сниженную симпатическую активность в терминальной стадии заболевания, вероятно, вследствие потери нейронов в ПЯ, что может увеличивать риск внезапной остановки сердца (Asai et al., 2007). Вовлечение вегетативной нервной системы сердца в раннюю стадию бокового амиотрофического склероза было измерено у 40 больных. Компьютерная томография (MIBG-SPECT) и вариабельность ритма сердца (ВРС) предоставляет информацию о симпатической и парасимпатической иннервации сердца. MIBG-SPECT является чувствительной диагностической методикой, определяющей раннюю симпатическую денервацию миокарда. И симпатическая, и парасимпатическая дисфункция была определена у 16 (40%) из 40 больных. Полученные результаты указывают, что все больные с БАС со степенью повреждения от начальной до умеренной имеют постганглионарную симпатическую адренергическую сердечную или кардиовагальную денервацию (Druschky et al., 1999).

В оригинальной работе (Murata et al., 1997), для того чтобы установить дисфункцию вегетативной нервной системы при БАС, было исследовано взаимоотношение между артериальным давлением и частотой пульса, QT-интервалом и коэффициентом вариации интервала R-R. Артериальное давление и частота пульса определялись каждые 30 минут в течение 24 часов у 6 больных БАС и 18 здоровых, схожих по возрасту. QT-интервал и коэффициент вариации интервала R-R также оценивался при помощи ЭКГ. Взаимоотношение между артериальным давлением и частотой пульса было потеряно в группе с БАС. Значительных различий между QT-интервалом и коэффициентом вариации интервала R-R между БАС и контрольной группой не было. Вероятнее всего, дисбаланс между артериальным давлением и частотой пульса в группе с БАС отражает нарушение взаимоотношения между сим-

патической и парасимпатической нервной системой, что подтверждается работой (Chida et al., 1989), в которой при исследовании вегетативной регуляции сердечно сосудистой системы при БАС с помощью количественных тестов по изучению вегетативной функции была выявилена субклиническая гиперфункция симпатической и гипофункция парасимпатической (вагальной) нервных систем, что, вероятно ,сказывается на нарушении функции сердечно-сосудистой системы в целом.

В Италии между 2000 и 2008 годами до момента смерти было исследовано 182 больных с БАС (Spataro et al., 2010) и создана единая база данных. Среди причин смерти 7,1% составили причины, связанные сердцем (т.е. внезапная сердечная смерть – 6,0%, инфаркт миокарда – 1,1%) (Corcia et al., 2008). Среди причин смерти наблюдавшихся 100 больных с БАС во Франции смерть от сердечной недостаточности составила 10%, причем она зарегистрирована в два раза чаще у больных с бульбарным типом БАС, чем со спинальным (Gil et al., 2008).

6. Дисфункция сердечно-сосудистой системы при болезни Хантингтона

Последние данные свидетельствуют о том, что индуцированные белком хантингтином энергетические нарушения способствуют появлению сбоев в работе нервной системы при болезни Хантингтона (БХ). Если учитывать высокий уровень экспрессии хантингтина, можно сделать вывод, что другие типы высокоэнергетических клеток организма также могут подвергаться риску возникновения нарушений при БХ. Раннее начало сердечно-сосудистых заболеваний является второй ведущей причиной смерти у пациентов с БХ, непосредственная роль хантингтина при этом остается неизученной (Kehoe et al., 1999; Kieburtz et al., 1994).

Была проверена гипотеза о том, что экспрессии хантингтина достаточно, чтобы вызвать нарушения функции сердца, используя хорошо описанную трансгенную модель БХ (линия R6/2). Нарушения работы сердца у мышей R6/2 развивались в возрасте 8 недель, прогрессировали до серьезного сбоя за 12 недель, что удалось определить при помощи эхокардиографии. Были получены ограниченные признаки ремоделирования сердца (гипертрофия, фиброз, апоптоз, снижение чувствительности β-1 адренергических рецепторов). Электронная микроскопия показала значительное повышение присутствия ядерного и митохондриального полиглутамина в миоцитах мышей R6/2. Были замечены значительные изменения ультраструктуры митохондрий, что согласуется с метаболическим стрессом. Наблюдалось увеличение ацетилирования сердечного лизина и нитрования белков, что было в значительной степени связано с нарушениями работы сердца. Эти данные показывают, что экспрессия хантингтина обладает мощным кардиотоксическим эффектом; сердечная недостаточность может являться серьезным осложнением у данной важной экспериментальной модели БХ. Авторы полагают, что исследование потенциальных кардиотропных эффектов хантингтина у людей может быть вполне обоснованным (Mihm et al., 2007; Sassone et al., 2009).

7. Заключение

Таким образом, мы рассмотрели имеющиеся в современной литературе данные о нарушении функций периферических возбудимых структур при НДЗ. Проведенный анализ показал, что практически все наиболее распространенные НДЗ сопровождаются периферическими дисфункциями на уровне нервно-мышечного аппарата и/или сердечно-сосудистой системы. Стоит отметить, что проведенный анализ не может представить вниманию читателя полный спектр дисфункций и дизрегуляторных процессов в периферических возбудимых тканях при НДЗ, поскольку при многих НДЗ периферические проявления практически не изучены. Хотим подчеркнуть, что описанные нами примеры дисфункции периферических возбудимых структур при НДЗ являются не просто интересными экспериментальными «находками», а представляют собой важные, не учтенные ранее аспекты патогенеза указанных заболеваний (в некоторых случаях – ключевые факторы патогенеза). Данные аспекты необходимо учитывать при постановке диагноза и назначении терапии пациентам с НДЗ. Считаем, что коррекция нарушенных функций периферических возбудимых структур позволит улучшить результаты комплексной терапии нейродегенеративных заболеваний.

Литература

Мухамедьяров М.А., Волков Е.М., Леушина А.В. и др. Ионные и молекулярные механизмы деполяризации скелетных мышечных волокон мыши под действием β-амилоидного пептида // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2011. Т. 97. С. 795-803.

Мухамедьяров М.А., Зефиров А.Л. Влияние β-амилоидного пептида на функции возбудимых тканей: физиологические и патологические аспекты // Успехи физиологических наук. 2013. Т. 44. С. 55-71.

Угрюмов М.В. Новые представления о патогенезе, диагностике и лечении нейродегенеративных заболеваний // Вестник РАМН, 2010. Т. 8. С. 6-19.

Asai H., Hirano M., Udaka F. et al. Sympathetic disturbances increase risk of sudden cardiac arrest in sporadic ALS // J. Neurol. Sci. 2007. Vol. 254. P. 78-83.

Bunch T.J., Weiss J.P., Crandall B.G., et al. Atrial fibrillation is independently associated with senile, vascular, and Alzheimer's dementia // Heart Rhythm. 2010. Vol. 7. P. 433-437.

Caccamo A., Oddo S., Sugarman M.C. et al. Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes: implications for Abeta-induced disorders // Neurobiol. Aging. 2005. Vol. 26. P. 645-654.

Carnevale D., Mascio G., D'Andrea I. et al. Hypertension induces brain beta-amyloid accumulation, cognitive impairment, and memory deterioration through activation of receptor for advanced glycation end products in brain vasculature // Hypertension. 2012. Vol. 60. P. 188-197.

Chida K., Sakamaki S., Takasu T. Alteration in autonomic function and cardiovascular regulation in amyotrophic lateral sclerosis // J. Neurol. 1989. Vol. 236. P. 127-130.

Corcia P., Pradat P. F., Salachas F. et al. Causes of death in a post-mortem series of ALS patients // Amyotroph. Lateral. Scler. 2008. Vol. 9. P. 59-62.

Crouch P.J., Harding S.M., White A.R. et al. Mechanisms of A beta mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease // Int. J. Biochem. Cell. Biol. 2008. Vol. 40. P. 181-198.

De la Torre J.C. Vascular risk factor detection and control may prevent Alzheimer's disease // Ageing. Res. Rev. 2010. Vol. 9. P. 218-225.

De Toledo Ferraz Alves T.C., Ferreira L.K., Wajngarten M. et al. Cardiac disorders as risk factors for Alzheimer's disease // J. Alzheimers Dis. 2010. Vol. 20. P. 749-763.

Dolan H., Crain B., Troncoso J. et al. Atherosclerosis, dementia, and Alzheimer disease in the Baltimore Longitudinal Study of Aging cohort // Ann. Neurol. 2010. Vol. 68. P. 231-240.

Druschky A., Spitzer A., Platsch G. et al. Cardiac sympathetic denervation in early stages of amyotrophic lateral sclerosis demonstrated by 123I-MIBG-SPECT // Acta. Neurol. Scand. 1999. Vol. 99. P. 308-314.

Dupuis L., Loeffler J.P. Neuromuscular junction destruction during amyotrophic lateral sclerosis: insights from transgenic models // Curr. Opin. Pharmacol. 2009. Vol. 9. P. 341-346.

Garden G.A., La Spada A.R. Intercellular (mis)communication in neurodegenerative disease // Neuron. 2012. Vol. 73. P. 886-901.

Gdynia H.J., Kurt A., Endruhn S. et al. Cardiomyopathy in motor neuron diseases // J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry. 2006. Vol. 77. P. 671-673.

Gil J., Funalot B., Verschueren A. et al. Causes of death amongst French patients with amyotrophic lateral sclerosis: a prospective study // Eur. J. Neurol. 2008. Vol. 15. P. 1245-1251.

Goldman W.P., Baty J.D., Buckles V.D. et al. Motor dysfunction in mildly demented AD individuals without extrapyramidal signs // Neurology. 1999. Vol. 53. P. 956-962.

Jefferson A.L., Himali J J., Beiser A.S. et al. Cardiac index is associated with brain aging: the Framingham Heart Study // Circulation. 2010. Vol. 122. P. 690-697.

Joachim C.L., Mori H., Selkoe D.J. Amyloid beta-protein deposition in tissues other than brain in Alzheimer's disease // Nature. 1989. Vol. 341. P. 226-230.

Kamenetz F., Tomita T., Hsieh H., et al. APP processing and synaptic function // Neuron. 2003. Vol. 37. P. 925-937.

Kehoe P., Krawczak M., Harper P.S. et al. Age of onset in Huntington disease: sex specific influence of apolipoprotein E genotype and normal CAG repeat length // J. Med. Genet. 1999. Vol. 36. P. 108-111.

Kieburtz K., MacDonald M., Shih C. et al. Trinucleotide repeat length and progression of illness in Huntington's disease // J. Med. Genet. 1994. Vol. 31. P. 872-874.

Kitazawa M., Green K.N., Caccamo A. et al. Genetically augmenting Abeta42 levels in skeletal muscle exacerbates inclusion body myositis-like pathology and motor deficits in transgenic mice // Am. J. Pathol. 2006. Vol. 168. P. 1986-1997.

Love S., Miners S., Palmer J. et al. Insights into the pathogenesis and pathogenicity of cerebral amyloid angiopathy // Frontiers in Bioscience. 2009. Vol. 14. P. 4778-4792.

Mehta P.D., Pirttila T., Mehta S.P. et al. Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease // Arch. Neurol. 2000. Vol. 57. P. 100-105.

Mihm M.J., Amann D.M., Schanbacher B.L. et al. Cardiac dysfunction in the R6/2 mouse model of Huntington's disease // Neurobiol. Dis. 2007. Vol. 25. P. 297-308.

Mukhamedyarov M.A., Grishin S.N., Yusupova E.R. et al. Alzheimer's beta-amyloid-induced depolarization of skeletal muscle fibers: implications for motor dysfunctions in dementia // Cell. Physiol. Biochem. 2009. Vol. 23. P. 109-114.

Mukhamedyarov M.A., Teplov A.Y., Grishin S.N. et al. Extraneuronal toxicity of Alzheimer's beta-amyloid peptide: comparative study on vertebrate skeletal muscles // Muscle and Nerve. 2011. Vol. 43. P. 872-877.

Mukhamedyarov M.A., Volkov E.M., Khaliullina D.F. et al. Impaired electro-genesis in skeletal muscle fibers of transgenic Alzheimer mice // Neurochem. Int. 2014. Vol. 64. P. 24-28.

Murata Y., Harada T., Ishizaki F. et al. An abnormal relationship between blood pressure and pulse rate in amyotrophic lateral sclerosis // Acta. Neurol. Scand. 1997. Vol. 96. P. 118-122.

Palotas A., Reis H.J., Bogats G. et al. Coronary artery bypass surgery provokes Alzheimer's disease-like changes in the cerebrospinal fluid // J. Alzheimers Dis. 2010. Vol. 21. P. 1153-1164.

Paris D., Patel N., DelleDonne A. et al. Impaired angiogenesis in a transgenic mouse model of cerebral amyloidosis // Neurosci. Lett. 2004. Vol. 366. P. 80-85.

Poehlman E.T., Dvorak R.V. Energy expenditure, energy intake, and weight loss in Alzheimer disease // Am. J. Clin. Nutr. 2000. Vol. 71. P. 650S-655S.

Querfurth H.W., LaFerla F.M. Alzheimer's disease // N. Engl. J. Med. 2010. Vol. 362. P. 329-344.

Reis H.J., Wang L., Verano-Braga T. et al. Evaluation of Post-Surgical Cognitive Function and Protein Fingerprints in the Cerebro-Spinal Fluid Utilizing Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (SELDI-TOF MS) After Coronary Artery Bypass Grafting: Review of Proteomic Analytic Tools and Introducing a New Syndrome // Curr. Med. Chem. 2011.

Rosendorff C., Beeri M.S., Silverman J.M. Cardiovascular risk factors for Alzheimer's disease // Am. J. Geriatr. Cardiol. 2007. Vol. 16. P. 143-149.
Rozas J.L., Gomez-Sanchez L., Tomas-Zapico C. et al. Increased neurotransmitter release at the neuromuscular junction in a mouse model of polyglutamine disease // J. Neurosci. 2011. Vol. 31. P. 1106-1113.
Sassone J., Colciago C., Cislaghi G. et al. Huntington's disease: the current state of research with peripheral tissues // Exp. Neurol. 2009. Vol. 219. P. 385-397.
Scheibel A.B., Duong T.H., Jacobs R. Alzheimer's disease as a capillary dementia // Ann. Med. 1989. Vol. 21. P. 103-107.
Selkoe D.J. Alzheimer's disease is a synaptic failure // Science. 2002. Vol. 298. P. 789-791.
Selkoe D.J., Podlisny M.B., Joachim C.L. et al. Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988. Vol. 85. P. 7341-7345.
Skoog I., Lernfelt B., Landahl S. et al. 15-year longitudinal study of blood pressure and dementia // Lancet. 1996. Vol. 347. P. 1141-1145.
Soininen H., Syrjanen S., Heinonen O. et al. Amyloid beta-protein deposition in skin of patients with dementia // Lancet. 1992. Vol. 339. P. 245.
Spataro R., Lo Re M., Piccoli T. et al. Causes and place of death in Italian patients with amyotrophic lateral sclerosis // Acta. Neurol. Scand. 2010. Vol. 122. P. 217-223.
Tian J., Shi J., Mann D.M. Cerebral amyloid angiopathy and dementia // Panminerva. Med. 2004. Vol. 46. P. 253-264.
Turdi S., Guo R., Huff A.F. et al. Cardiomyocyte contractile dysfunction in the APPswe/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease // PLoS One. 2009. Vol. 4. P. e6033.
Van Nostrand W.E., Melchor J.P., Ruffini L. Pathologic amyloid beta-protein cell surface fibril assembly on cultured human cerebrovascular smooth muscle cells // J. Neurochem. 1998. Vol. 70. P. 216-223.
Wirths O., Bayer T.A. Motor impairment in Alzheimer's disease and transgenic Alzheimer's disease mouse models // Genes Brain Behav. 2008. Vol. 7. Suppl. 1. P. 1-5.
Zamolodchikov D., Strickland S. Abeta delays fibrin clot lysis by altering fibrin structure and attenuating plasminogen binding to fibrin // Blood. 2012. Vol. 119. P. 3342-3351.

Инъекционные модели болезни Альцгеймера как подход к исследованию клеточных механизмов патогенеза: нейродегенеративных изменений, воспаления, нарушений нейрогенеза

М.Ю. Степаничев, Н.В. Гуляева

Содержание

1. Введение
2. Основные инъекционные модели БА
3. Нейродегенеративные процессы и гибель клеток в инъекционных моделях БА
4. Исследование механизмов нейровоспаления в инъекционных моделях БА
5. Исследование процессов нейрогенеза в инъекционных моделях БА
6. Заключение

1. Введение

Для понимания механизмов развития болезни Альцгеймера (БА) и разработки эффективных подходов к лечению этого фатального заболевания, и весьма вероятно, и других хронических нейродегенеративных патологий, принципиально важным является понимание возможностей и ограничений при моделировании на животных механизмов специфических человеческих патологий. С сожалением приходится вновь констатировать, что в настоящее время не существует ни одной экспериментальной модели, которая позволяла бы полностью воспроизводить все когнитивные, поведенческие, биохимические и гистопатологические признаки БА, наблюдающиеся у пациентов. За два года, прошедшие с момента первого издания настоящей монографии, в печати появилось более 20 000 публикаций, посвященных исследованию различных аспектов БА. Среди этих статей более 2000 работ выполнено на моделях, воспроизводящих разнообразные симптомы и/или механизмы патогенеза БА. Примерно половина этих работ выполнена с использованием трансгенных животных, в первую очередь мышей, которые позволяют в определенной степени моделировать разные стороны семейных (наследственных) форм БА, тогда как в остальных использованы иные подходы к моделированию, включая инъекции разнообразных нейротоксичных субстанций в мозг животных, в первую очередь грызунов. Тем не менее, даже в случае наиболее удачных моделей, полученных с помощью генетических манипуляций, приходится говорить, что они воспроизводят патогенез крайне незначительной части случаев, которые принято

Сокращения: АХЭ – ацетилхолинэстераза; БА – болезнь Альцгеймера; ВТАХ – везикулярный транспортер ацетилхолина; ГЭБ – гемато-энцефалический барьер; ЗФ – зубчатая фасция; СВЗ – субвентрикулярная зона; СГЗ – субгранулярная зона; ФНОα – фактор некроза опухоли-α; ХАТ – холинацетилтрансфераза; Аβ – амилоидный-β-пептид; bFGF – основный фактор роста фибробластов; BrdU – 5'-бромо-2'-дезоксиуридин; Dcx – даблкортин; EGF – эпидермальный фактор роста; МНС – белки основного класса гистосовместимости; NGF – фактор роста нервов.

относить к БА. Бóльшая часть больных страдает от так называемой спорадической формы БА, которая возникает у значительной части пациентов преклонного возраста. В связи с этим необходимо выделить наиболее общие характерные изменения, которые отличают стареющий мозг от мозга молодых и зрелых людей. Независимо от генетических факторов существует ряд клеточных и молекулярных изменений, которые наблюдаются в стареющем мозге, как и в других органах человека. К таковым следует отнести усиление окислительного стресса, нарушения энергетического метаболизма клеток, нарушения кальциевого сигналинга, накопление поврежденных белков и органелл (Stranahan, Mattson, 2012). Другими, более специфичными для ЦНС чертами старения являются активация нейровоспалительных процессов на клеточном и молекулярном уровнях (Krstic, Knuesel, 2013) и существенное снижение нейрогенеза (Lazarov et al., 2010; Hamilton et al., 2013). При этом не всегда проявление указанных фундаментальных механизмов старения мозга сопровождается выраженными когнитивными нарушениями. Поэтому одним из наиболее сложных вопросов исследования нейродегенеративных патологий, включая БА, является вопрос о том, каким образом возрастные изменения превращаются в стартовую площадку для нейродегенеративной патологии. Что является причиной срыва адаптационных механизмов, ответственных за устойчивость к возрастным изменениям, и развития нейродегенерации, т.е. структурных и функциональных нарушений деятельности клеток мозга и/или их гибели? Поиски подходов к ответу на эти вопросы в значительной степени и определяет разнообразие моделей нейродегенеративных заболеваний.

Помимо этой, как представляется, *главной* проблемы, создание модели БА на животных имеет целый ряд трудностей как методического, так и методологического характера. Это связано, с одной стороны, с многофакторной этиологией БА, включающей генетические и негенетические факторы, а с другой стороны, с особенностями моделирования различных патологических процессов на животных. Моделирование на животных может иметь различную специфику в зависимости от поставленной задачи. Например, модели могут отражать отдельные симптомы заболевания, сходные с клиническим течением конкретной патологии. Вторым важным аспектом моделей является сходство патофизиологических механизмов течения заболевания в клинике и у животных. Третьим важным моментом является приемлемость данной модели для тестирования методов лечения патологии.

2. Основные инъекционные модели БА

БА – нейродегенеративное заболевание, которое приводит к нарушению деятельности отделов головного мозга, связанных с когнитивными функциями. В связи с этим может быть использован ряд стратегий для моделирования БА *in vivo* в зависимости от конечной цели, например: исследования природы нарушения того или иного вида памяти или механизмов, лежащих в основе гибели нейронов.

Дегенерация холинергических нейронов базальных ядер переднего мозга – один из наиболее ранних этапов БА, коррелирующий с проявлением когнитивно-

го дефицита у пациентов (Coyle et al., 1983; Winkler et al., 1998). В связи с этим модели, созданные с помощью фармакологических воздействий, воспроизводящих холинергический дефицит, наблюдаемый на ранних стадиях БА, можно отнести к традиционным (McDonald, Overmier, 1998; Yamada, Nabeshima, 2000). Этот подход использовали как в экспериментах на грызунах, так и в работах на приматах. С этой целью обычно инъецируют антагонисты мускариновых ацетилхолиновых рецепторов, такие как скополамин, или повреждают определенные структуры мозга. К последней категории относятся модели, включающие разрушение крупноклеточного базального ядра, септо-гиппокампального пути или гиппокампа, которые могут быть реализованы различными средствами, например при помощи возбуждающих аминокислот (N-метил-D-аспартата, каината, хинолината, квискволата и т.п.). Как правило, эти модели позволяют получить у животных нарушения обучения и памяти, которые в большей или меньшей степени связаны с гипофункцией холинергической системы. Критический обзор этих моделей был дан в работе (McDonald, Overmeier, 1998). Такой подход позволяет получить так называемые аналогичные модели – моделировать поведенческий и холинергический дефицит у животных, однако без характерной патоморфологической картины течения БА (т.е. без образования амилоидных бляшек и нейрофибриллярных сплетений). Следует отметить также, что при БА обнаружена и существенная утрата глутаматергических ассоциативных связей в коре, которая коррелирует с тяжестью патологии (Francis et al., 1993). Поэтому моделирование на животных с использованием только антихолинергических агентов не может рассматриваться как полноценная модель БА.

В конце 1980-х – 1990-х годах были разработаны новые подходы к моделированию БА на животных, прежде всего грызунах. Среди них можно выделить использование внутримозговых инъекций специфического холинотоксина AF64A (этилхолин азиридиний) или селективного цитотоксина 192-IgG-сапорина (Walsh, 1997). AF64A – токсический аналог холина, который был исходно предложен в качестве холинергического нейроспецифичного токсина. Установлено, что в малых дозах (1–3 нмоль) AF64A вызывает продолжительную холинергическую гипофункцию (Hanin et al., 1987) и гибель холинергических нейронов в медиальном ядре перегородки (Chrobak et al., 1988; Lorens et al., 1991). AF64A имеет холиноподобную структуру, соединенную с высокореактивным цитотоксическим азиридиниевым кольцом. Благодаря такому сходству система транспорта холина может захватывать AF64A и вносить его внутрь клетки, где токсин угнетает синтез ацетилхолина. Это выражается в первую очередь в нарушении системы активного транспорта холина, снижении активности холинацетилтрансферазы (ХАТ), холинкиназы, холиндегидрогеназы, ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в холинергических теминалях (Hanin et al., 1987; Hanin, 1996). Эти процессы приводят к возникновению пресинаптической холинергической гипофункции, сопровождающейся снижением синтеза и высвобождения ацетилхолина. Указанный эффект является специфическим, поскольку AF64A не влияет существенно на активность ферментов, которые не используют холин в качестве субстрата. Не изменяются и уровни других нейротрансмиттеров, а именно: дофамина, норадреналина, серотонина и их метаболитов как в гиппокампе, так и в стриатуме, амигдале, фронтальной и париетальной коре (Chrobak et

al., 1988, 1989; Walsh, 1997). AF64A снижает активность ХАТ в гиппокампе крыс, не затрагивая при этом фронтальную и париетальную кору, стриатум, амигдалу (Chrobak et al., 1988; Lorens et al., 1991; Walsh et al., 1994). Следует отметить, что хотя AF64A является нейротоксином, воздействующим на холинергические клетки, он может также вызывать изменения норадренергической и серотонинергической трансмиссии (Eva et al., 1987).

Холинергическая гипофункция сопровождается когнитивными нарушениями, проявляющимися в различных поведенческих тестах, позволяющих оценить состояние процессов памяти у крыс. Было установлено, что введение AF64A нарушает выработку и сохранение условной реакции пассивного избегания (Abe et al., 1993; Bailey et al., 1986; Brandeis et al., 1986; Mannisto et al., 1994; Miyamoto et al., 1993; Walsh et al., 1984; Yamammoto et al., 1993), равно как и обучение и воспроизведение реакции активного избегания (Mannisto et al., 1994; Miyamoto et al., 1993). AF64A ухудшает выполнение животными задач, требующих участия пространственной памяти – обучение в радиальном лабиринте (Brandeis et al., 1986; Walsh et al., 1984) и водном лабиринте (Brandeis et al., 1986; Opello et al., 1993; Wortwein et al., 1994; Yehuda et al., 1995). В то же время, Д.К. Лим с сотрудниками (Lim et al., 2001) показали, что нарушения пространственной и непространственной памяти у крыс после AF64A со временем исчезают. Расширенное тестирование с AF64A в более сложных задачах до сих пор не предпринималось. Вероятно, как и в случае повреждения крупноклеточного базального ядра, AF64A может приводить к возникновению состояний, характерных для более поздних стадий БА, при которых происходит дегенерация в базо-кортикальном холинергическом пути (McDonald, Overmier, 1998).

Еще одним токсином, который получил широкое распространение в исследованиях, направленных на понимание патологии холинергической системы при БА, является иммуноглобулин 192-IgG-сапорин. Этот иммунотоксин был создан на основе моноклонального антитела к низкоаффинному рецептору фактора роста нервов (NGF) p75NTR и гликозида мыльнянки лекарственной сапорина (Wiley et al., 1991). Токсическое действие сапорина связано с инактивацией рибосом. Связываясь с рецепторами p75NTR, расположенными на мембране холинергических нейронов, 192-IgG-сапорин проникает внутрь клетки по механизму, сходному с нейротрофином NGF, и ретроградно транспортируется клеткой в сому, где расщепляется с высвобождением сапорина. Сапорин инактивирует рибосомы нейрона, что приводит к гибели клетки. Известно, что интрацереброventрикулярное введение 192-IgG-сапорина вызывает существенное снижение функциональных показателей холинергической системы в проекционных зонах холинергических нейронов, новой коре и гиппокампе, значительному уменьшению иммунореактивности ХАТ и АХЭ в медиальном септальном ядре и диагональном ядре полоски Брока (Waite et al., 1994, 1995). В то же время, изменения обучения и памяти у крыс после введения этого иммунотоксина не столь однозначны. Некоторые авторы сообщают о нарушении памяти у крыс при обучении в водном лабиринте Морриса (Waite et al., 1994, 1995), а другие отмечают отсутствие выраженного эффекта 192-IgG-сапорина на пространственное обучение и память, отмечая, что изменения памяти, наблюда-

емые в водном лабиринте, в большей степени связаны с нарушением поведения вообще (Baxter et al., 1995, 1996).

Модели БА, использующие свойства амилоидного-β-пептида (Аβ), можно разделить на две большие группы: трансгенные и нетрансгенные модели. Несмотря на большую популярность работ с использованием методов генной инженерии, позволяющих получать лабораторных животных, экспрессирующих в мозге белок-предшественник Аβ, число исследований с применением относительно простого введения различных фрагментов Аβ продолжает увеличиваться. Это связано с несколькими факторами. Во-первых, как уже отмечалось, число генетически обусловленных случаев семейных форм БА относительно невелико. Во-вторых, главное преимущество трансгенных моделей – образование амилоидных бляшек в мозге – проявляется только при довольно высоком уровне экспрессии гена белка-предшественника Аβ человека в мозге мышей. В-третьих, отсутствие значительных нейродегенеративных изменений у трансгенных мышей не позволяет моделировать механизмы патогенеза БА, связанные с гибелью нейронов.

Введение Аβ в мозг животных (крыс или мышей) приводит к развитию дисфункции, связанной с нейродегенерацией и нарушениями процессов обучения и памяти. Способность Аβ и его синтетических аналогов вызывать когнитивный дефицит была продемонстрирована разными авторами. Так, введение пептидов Аβ(1-40) и Аβ(12-28) в мозг нарушало воспроизведение реакции активного избегания в Y-образном лабиринте у мышей (Flood et al., 1991, 1994) и крыс (McDonald et al., 1994), обучение пассивному избеганию (Nabeshima et al., 1994) и обучение в Y-образном лабиринте с использованием пищевого подкрепления у крыс (McDonald et al., 1994, 1996). Инъекция Аβ(1-42) в базальные ядра вызывала нарушение выработки пассивного избегания и нарушение поведения в тесте «открытое поле» (Harkany et al., 1998, 1999). Хроническое введение Аβ(1-42) в латеральные желудочки мозга крыс также нарушало поведение в водном лабиринте (Nitta et al., 1994). Острые и хронические интрагиппокампальные инъекции Аβ(1-40) не нарушали выполнение стандартной задачи в 8-рукавном лабиринте (McDonald et al., 1994), хотя острая инъекция нарушает выполнение этой задачи при 30-секундной задержке между 4 и 5 выборами рукавов (Sweeney et al., 1997). Приведенные данные свидетельствуют о том, что инъекции Аβ-пептидов вызывали возникновение амнезии у мышей и крыс.

В своих экспериментах Т. Маурик с сотрудниками (Maurice et al., 1996, 1998) индуцировали амнезию у мышей с помощью центрального введения агрегированного Аβ(25-35). Введение Аβ(25-35) до обучения вызывало дозо-зависимое нарушение рабочей памяти в тесте спонтанного чередования рукавов в Y-образном лабиринте и нарушение обучения и воспроизведения реакции пассивного избегания. Эти нарушения поведения наблюдались при однократном введении агрегированного Аβ(25-35) в дозах 3 и 9 нмоль. Введение Аβ(25-35) крысам вызывало нарушение пространственной рабочей памяти в радиальном 8-рукавном лабиринте (Степаничев и др., 2004а,б; Stepanichev et al., 2003a,b, 2004; Yamaguchi, Kawashima, 2001) и обучения в Y-образном лабиринте (Степанов и др., 2006). Инъекция агрегированного Аβ(25-35) в боковые желудочки мозга крыс вызывала нарушение памяти в водном лабиринте (Муганцева, Подольский, 2009; Delobette et al., 1997).

Введение Аβ(25-35) в ядра перегородки (Terranova et al., 1996) или боковые желудочки мозга крыс (Klimentiev et al., 2007; Stepanichev et al., 2003a,b; Степаничев и др., 2000) нарушало обонятельную память в тесте социального взаимодействия (social recognition) у крыс. У крыс введение Аβ(25-35) вызывает нарушение ориентировочно-исследовательского поведения в тесте «открытого поля» (Пшенникова и др., 2005; Степаничев и др., 1997) Ряд авторов продемонстрировали трудности выработки и сохранения реакции пассивного избегания у крыс, вызванные введением Аβ(25-35) (Nabeshima et al., 1994: Yamaguchi, Kawashima,2001), однако этот эффект Аβ(25-35) в значительной мере зависит от дозы пептида и времени наблюдения после его введения (Stepanichev et al., 2003a,b, 2006).

Нарушения краткосрочной пространственной памяти в водном лабиринте Морриса были продемонстрированы на крысах после билатеральных инъекций Аβ(25-35) в гиппокампальные области CA1-CA3 (Chen et al., 1996a,b). Е.М. Сигурдссон с сотрудниками (Sigurdsson et al., 1997a) показали, что билатеральные интраамигдалярные инъекции Аβ(25-35) не оказывали влияния на поведение в водном лабиринте Морриса и условную реакцию одностороннего избегания, вызывая лишь незначительные изменения поведения крыс в тесте «открытого поля». На отсутствие влияния Аβ на процессы обучения и памяти указывают и некоторые другие авторы (Von Linstow Roloff et al., 2002).

Впервые способность Аβ(1-40) вызывать дегенерацию нейронов и их отростков в мозге *in vivo* была продемонстрирована Н. Коваллом с сотрудниками (Kowall et al., 1992). В других ранних работах *in vivo* при инъекциях Аβ в гиппокамп и кору больших полушарий мозга крыс не удавалось обнаружить существенных изменений, которые были бы сходны с морфологической картиной БА (Games et al., 1992; Stein-Behrens et al., 1992). По всей видимости, отсутствие эффектов Аβ могло быть связано с использованием в этих исследованиях неагрегированных пептидов, поскольку известно, что нейродегенерация, вызванная Аβ *in vitro*, зависит от его фибриллярной b-структуры: агрегированный Аβ обладает большей нейротоксичностью по сравнению с неагрегированным пептидом (Delobette et al., 1997; Pike et al., 1995). Позднее нейротоксичность фибриллярных фрагментов Аβ *in vivo* была неоднократно подтверждена в работах разных исследовательских коллективов (Степаничев и др., 2000, 2004a; Geula et al., 1998; Giovannelli et al., 1995; Harkany et al., 1998; Maurice et al., 1996; Nitta et al., 1994; Sigurdsson et al., 1997a,b; Stepanichev et al., 2004, 2006; Weldon et al., 1998). Нейротоксические свойства целого пептида сохраняются и у ряда фрагментов, в частности характерны для фрагмента Аβ (25-35). Н. Ковалл с сотрудниками (Kowall et al., 1992) установили, что инъекция Аβ(25-35) в кору больших полушарий мозга крыс вызывала локальный некроз в месте введения, окруженный зоной гибели нейронов и глиозом, однако дистантной нейродегенерации не наблюдалось. Интрагиппокампальные инъекции агрегированного Аβ(25-35) вызывали повреждения в гиппокампе крыс и действовали на уровни нейротрансмиттеров в двух подкорковых структурах, которые имеют проекции аксонов в гиппокампе: голубом пятне и медиальной перегородке (Chen et al., 1996a; Stepanichev et al., 2003b). Унилатеральное введение Аβ(25-35) в амигдалу крыс вызывало экспрессию белка тау-2 в телах нервных клеток ипсилатеральных

амигдалы, цингулярной коры и гиппокампа и иммунореактивность к антителам Alz-50 в ипсилатеральной амигдале (Sigurdsson et al., 1996).

Следует заметить, что сроки возникновения когнитивных нарушений после различных манипуляций значительно варьируют. Так, введение фрагментов Ab в структуры или латеральные желудочки мозга приводит к возникновению амнезии, которая проявляется начиная с 4-го дня после операции (Yamaguchi, Kawashima, 2001), и, как установлено в работах М. Степаничева (Степаничев и др., 2000; Stepanichev et al., 2003a), сохраняется, по крайней мере, до 180-го дня после введения. В то же время, некоторые функциональные нарушения после введения Aβ(25-35) могут иметь приходящий характер. Например, было показано (Stepanichev et al., 2014), что нарушение выработки и воспроизведения условной реакции замирания на предъявление экспериментального контекста возникало через 12 дней после введения Aβ(25-35). В то же время, при тестировании через 6 и 28 дней после инъекции Aβ(25-35) животные демонстрировали уровень фризинга, сходный с контролем. Эти результаты согласуются с полученными ранее данными (Urani et al., 2004; Wang et al., 2007; Tsunekawa et al., 2008; Jin et al., 2009; Dineley et al., 2010). Время возникновения нарушений памяти также было сходным с тем, что сообщали другие авторы. В то же время, в большинстве из цитированных работ эта форма поведения была исследована лишь однажды, и практически ни в одной из них не сообщалось о временном развитии когнитивных нарушений после введения Aβ.

Ранее было показано, что нарушения контекст-зависимой памяти коррелируют с холинергической дисфункцией (Jin et al., 2009), включая снижение уровня ацетилхолина, активности и экспрессии гена ХАТ. Кроме того, ингибирование АХЭ (Tsunekawa et al., 2008) или аллостерическое потенцирование рецепторов ацетилхолина (Wang et al., 2007) снижало выраженность когнитивных нарушений, вызванных Aβ(25-35). В нашей работе было установлено, что появление нарушений памяти было связано со снижением числа ХАТ-позитивных нейронов в медиальном септальном ядре, которое наблюдалось через 12 дней после введения Aβ(25-35) в боковые желудочки мозга (Stepanichev et al., 2014). Вместе с тем, через 28 дней после воздействия, несмотря на то что число холинергических нейронов оставалось сниженным, поведение крыс в тесте условно-рефлекторного замирания не было нарушено.

3. Нейродегенеративные процессы и гибель клеток в инъекционных моделях БА

Важным аспектом моделирования нейродегенеративной патологии является наличие структурных изменений нейронов и/или их гибель. В этом отношении введение AF64A не позволяет существенно приблизиться к моделированию гистопатологических изменений, наблюдающихся при БА. Было показано, что AF64A существенно уменьшает число холинергических нейронов в медиальном ядре перегородки (Степаничев и др., 2007; Chrobak et al., 1988; Gulyaeva et al., 1996; Lorens et al., 1991; Walsh et al., 1994). Указанные эффекты являются дозозависимыми, и ис-

пользование больших доз AF64A влечет за собой возникновение неспецифических последствий, связанных с высокой токсичностью этого соединения по отношению к нервным клеткам (Eva et al., 1987). Например, односторонняя инъекция AF64A в черную субстанцию у крыс вызывает разрушение дофаминергических нейронов и вызванное этим ипсилатеральное вращение (Jarrard et al., 1985).

Несмотря на то что в культуре холинергических клеток NG108-15 AF64A вызывает апоптоз (Kuwagata, Inoue, 2009), ранее было показано (Rinner et al., 1997), что апоптоз в мозге крыс после введения этого токсина не связан с его специфическим холинотоксическим эффектом. Более того, апоптозу подвергаются как нервные, так и не нервные клетки преимущественно в области, прилегающей к месту введения. Гибель клеток может быть связана также с повреждением генома, которое вызывается алкилирующим действием AF64A на нуклеиновые кислоты (Hanin, 1997). Наряду с алкилированием причиной повреждения нуклеиновых кислот может являться активация процессов свободнорадикального окисления. Окислительный стресс может быть одним из инициаторов апоптотической гибели клеток (Simon et al., 2000), которую вызывает AF64A i*n vivo* и *in vitro* (Rinner et al., 1997). Н. Гуляева и др. (Gulyaeva et al., 1996) показали, что в течение первой недели после введения AF64A происходило накопление продуктов перекисного окисления липидов и усиление генерации активных форм кислорода в коре больших полушарий, гиппокампе и подкорковых структурах. При этом наблюдалось компенсаторное усиление антирадикальной защиты. В пользу возможного участия механизмов окислительного стресса в нейротоксических эффектах AF64A свидетельствуют и работы ряда других авторов, которые на этой модели продемонстрировали защитное влияние различных видов воздействий, обладающих способностью купировать окислительный стресс, таких как введение антиоксиданта витамина Е (Wortwein et al., 1994), ганглиозидов (Emerich, Walsh, 1990), или трансплантация эмбриональной ткани (по-видимому, за счет повышения уровня нейротрофических факторов, поддерживающих антиоксидантную защиту) (Emerich et al., 1992).

Введение AF64A вызывает снижение активности синтазы оксида азота (NO-синтазы) в гиппокампе (Моисеева и др., 2001; Lautenshlager et al., 2000). Этот эффект был непродолжительным и по времени совпадал с интенсивным окислительным стрессом. Кроме того, наблюдалось снижение числа клеток, экспрессирующих гистохимический маркер NO-синтазы – НАДФН-диафоразу – в ядрах перегородки (Степаничев и др., 2007). По данным литературы, ингибирование NO-синтазы метиловым эфиром N-нитро-L-аргинина способствовало усилению холинотоксического эффекта AF64A (Lautenshlager et al., 2000). Ингибиторы специфических изоформ NO-синтазы не влияют существенно на нейротоксичность AF64A (Lautenshlager et al., 1997). Это свидетельствует о том, что в этой модели БА снижение активности NO-синтазы способствует развитию септо-гиппокампальной нейродегенерации. Возможно, именно недостаточная генерация NO за счет инактивации NO-синтазы и гибели содержащих ее клеток перегородки является одной из причин токсичности AF64A.

Исчезновение иммунореактивности к ХАТ в комплексе медиальное септальное ядро – диагональное ядро полоски Брока является отличительной чертой патологи-

ческих процессов в мозге после введения 192-IgG-сапорина (Rossner et al., 1995). Несмотря на то что отмечается специфический эффект этого токсина на нейроны крупноклеточного холинергического комплекса базальных ядер, авторы не приводят явных доказательств гибели нейронов в этой области мозга. Позднее те же авторы, используя электронную микроскопию, показали наличие дегенерирующих нейронов в медиальной септальной области через 7 дней после введения нейротоксина (Seeger et al., 1997), однако они не привели никаких количественных данных.

Гистологические исследования после введения агрегированного Aβ(25-35) в боковой желудочек мозга мышей выявили умеренную, но достоверную потерю клеток во фронто-париетальной коре и гиппокампе (Maurice et al., 1996). Более того, авторам этой работы удалось установить наличие диффузных депозитов Aβ в коре больших полушарий. К сожалению, в аналогичных экспериментах, проведенных на крысах с использованием того же пептида, не удалось обнаружить образования отложений Aβ (Delobette et al., 1997; Gulyaeva et al., 1998; Степаничев и др., 2000), хотя гибель нейронов наблюдалась регулярно в коре больших полушарий, гиппокампе, базальных ядрах переднего мозга.

Динамика возникновения патологических изменений в мозге крыс после введения агрегированного Aβ(25-35) в боковые желудочки была прослежена в ряде работ. Было установлено, что выраженные патологические изменения в гиппокампе, базальных ядрах проявляются не ранее чем через месяц после введения пептида (Степаничев и др., 2000). Вместе с тем существенная потеря нейронов поля CA1 гиппокампа возникает примерно через три месяца после воздействия (Степаничев и др., 2004a; Stepanichev et al., 2004). Более того, нейропатологические изменения в гиппокампе и фронто-париетальной коре сохраняются примерно в течение шести месяцев после введения Aβ(25-35) (Степаничев и др., 2000). Важно заметить, что нарушения поведения, вызываемые Aβ, наблюдаются даже после однократной инъекции и происходят при отсутствии накоплений Aβ в мозге. Это особенно интересно с точки зрения патофизиологии и симптоматики БА (McDonald, Overmier, 1998). Известно, что специфические нарушения памяти при БА происходят в первые несколько лет развития болезни, когда значительных накоплений Aβ в форме бляшек еще не наблюдается (Braak, Braak, 1991). Следовательно введение Aβ может служить моделью для изучения изменений в мозге, наблюдаемых на ранних стадиях БА.

Й. Ямагучи и С. Кавашима (Yamaguchi, Kawashima, 2001) показали, что число ХАТ-позитивных нейронов в медиальном септальном ядре и активность ХАТ были достоверно снижены через 8 дней после инъекции Aβ(25-35) в боковые желудочки. Авторы предположили, что это снижение связано с гибелью холинергических нейронов, хотя и не проводили подсчета клеток. Полученные нами данные (Stepanichev et al., 2014) четко показывают, что нейроны медиальной перегородки не исчезают, т.к. число клеток, экспрессирующих нейрональный ядерный белок NeuN, маркер нейронов, не изменяется после введения Aβ(25-35), хотя наличия признаков дегенерации у этих клеток также исключить нельзя. Эти результаты подтверждают полученные нами ранее данные об отсутствии существенных морфологических изменений в медиальном септальном ядре после интрацеребровентрикулярного

введения агрегированного Аβ(25-35) (Степаничев и др., 2000). Можно предположить, что наблюдавшиеся в этой работе нарушения памяти не связаны с гибелью холинергических нейронов медиальной перегородки. Не исключено, однако, что длительные и стойкие нарушения памяти возникают, когда проявляются дополнительные повреждения мозга, такие как нейродегенерация в гиппокампе, базальных ядрах и/или в неокортексе.

Введение Аβ(25-35) вызывало снижение активности генов ХАТ и везикулярного транспортера ацетилхолина (ВТАХ) в медиальной септальной области без (до?) гибели холинергических нейронов (Stepanichev et al., 2014). Гены ХАТ и ВТАХ находятся в так называемом холинергическом локусе 10-й хромосомы и регулируются согласованно. Эти два гена отвечают за продукцию белков, необходимых для проявления холинергического фенотипа (Berrard et al., 1995; Mallet et al., 1998). Было установлено, что явное снижение числа ХАТ-позитивных нейронов возникало в медиальном септальном ядре через 12 дней после введения Аβ(25-35), тогда как уровни мРНК ХАТ и ВТАХ у этих животных не отличались от контрольных. Интересно, что несколько групп исследователей показали, что ранние эффекты Аβ в культуре нейронов могут быть связаны с его влиянием на процессы синтеза белка. Так, Х. Шан и др. (Shan et al., 2007) продемонстрировали, что уровень синтеза белка снижен в морфологически интактных нейронах через сутки после аппликации Аβ в первичную культуру нейронов. Эти авторы предположили, что такой эффект Аβ связан с появлением большого числа тяжелых полирибосом. Эти данные недавно были подтверждены в условиях *in vivo* (Гордон и др., 2012). Введение Аβ(25-35) в гиппокамп сопровождалось снижением уровня синтеза белка из-за избыточного образования тяжелых полирибосом. Сходный эффект был обнаружен и через 14 дней после интрацереброventрикулярного введения Аβ(25-35). Эти данные могут объяснить, почему при «нормальном» уровне экспрессии мРНК ХАТ в медиальной септальной области, обнаруженном через 12 дней после инъекции Аβ(25-35) в боковые желудочки, наблюдалось снижение экспрессии белка ХАТ, оцененное по числу ХАТ-позитивных клеток. Кроме того, нарушения синтеза белка могли быть вызваны избыточной генерацией активных форм кислорода, которые способны окислять РНК и вызывать образование тяжелых полирибосом (Shan et al., 2007; Ding et al., 2005). Окислительный стресс развивается в мозге в течение первого месяца после инъекции Аβ (Степаничев и др., 2000, Stepanichev et al., 2004). Известно также, что олигомерные формы Аβ ингибируют процессы трансляции *in vitro* (Virok et al., 2011). Помимо этого было убедительно показано, что утрата фенотипических особенностей не всегда сопровождается гибелью клетки. Так, в работе (Icard-Liepkalns et al., 1993) сообщалось, что адаптация к определенным условиям среды может приводить к смене адренергического на холинергический фенотип в нейронах. О.М. Лазо с сотрудниками (Lazo et al., 2010) показали, что через 3 недели после аксотомии наблюдается утрата холинергического фенотипа в нейронах медиального септального ядра. При этом происходит даун-регуляция рецепторов фактора роста нервов, что снижает возможность этих нейронов реагировать на нейротрофин. В нашей работе также было обнаружено достоверное снижение мРНК-специфического рецептора фактора роста нервов Ntrk1 (TrkA),

при этом уровень мРНК был достоверно ниже у крыс, получавших Аβ(25-35), по сравнению с контролем. Это происходило на этапе, предшествовавшем снижению числа ХАТ-позитивных нейронов. При этом уровень экспрессии белка рецептора TrkA в мозге крыс существенно не изменялся после введения Аβ(25-35) при оценке на срезах мозга с помощью антител к TrkA через 6 дней, но постепенно снижался к 12-му дню после введения Аβ(25-35). Следует отметить, что даже увеличение уровня мРНК Ntrk1, наблюдавшееся в медиальной септальной области крыс обеих групп через 12 дней после операции и сохранявшееся на более высоком уровне у крыс, инъецированных Аβ(25-35), не приводило к нормализации экспрессии рецептора. Таким образом, вероятно, что, как и в случае аксотомии, исчезновение холинергического фенотипа в нейронах медиальной перегородки сопровождалось изменением экспрессии рецептора, обеспечивающего восприятие сигнала фактора роста нервов, необходимого, как можно предположить, не столько для выживания, сколько для нормального функционирования этих клеток. Эта гипотеза может рассматриваться как наиболее важный результат проведенной работы.

Можно предположить, что нарушения в системе трофического обеспечения приводят к дедифференцировке нейронов и активации механизмов клеточного деления. Активация клеточного цикла в нейронах была убедительно показана при БА (Arendt et al., 1998; Hoozemans et al., 2002; Yang et al., 2003; Mosch et al., 2007). Экспрессия различных факторов клеточного цикла была также продемонстрирована в моделях токсичности Аβ (Varvel et al., 2008; Malik et al., 2008). Поэтому можно заключить, что утрата холинергического фенотипа вследствие нарушения процессов трофического обеспечения может быть начальным этапом на пути к гибели нейронов индуцированной Аβ(25-35).

4. Исследование механизмов нейровоспаления в инъекционных моделях БА

Воспаление представляет собой важнейшую реакцию живого организма на повреждающее воздействие. В патологии принято разделять воспаление на острое и хроническое. Острое воспаление – это срочная форма ответа организма на действие повреждающего агента, которая по сути является защитной реакцией, направленной на устранение или репарацию повреждения. Хроническое воспаление – реакция организма на длительное воздействие повреждающего стимула. На периферии острое и хроническое воспаление различаются по форме клеточного ответа, который проявляется в виде инфильтрации полиморфноядерных или мононуклеарных лейкоцитов, соответственно, в зону повреждения. В ЦНС воспалительный ответ проявляется в форме реактивного глиоза (Streit et al., 2004). Эндогенная реакция ЦНС на повреждение сопровождается накоплением увеличенных в размере астроцитов и микроглиоцитов, которые появляются сразу же после повреждения нервной ткани. Глиальная реакция на повреждение является активной, т.к. сопровождается высвобождением из глиоцитов таких факторов, которые действуют на клетки-мишени и вызывают в них ответную реакцию, подобно тому как это про-

исходит в периферических органах и тканях при активации иммунного ответа. В норме проникновение клеток иммунной защиты в мозг крайне затруднено благодаря наличию гемато-энцефалического барьера (ГЭБ). Разрушение ГЭБ способствует инфильтрации лейкоцитов и сопровождается воспалительным ответом, сходным с таковым на периферии.

Вызванные активацией иммунного ответа повреждения нейронов характерны для многих нейродегенеративных заболеваний, включая БА (Akiyama et al., 2000). На вовлеченность механизмов воспаления в нейродегенеративный процесс указывают и работы, проведенные на инъекционных моделях БА. Так, дегенерация холинергических нейронов в медиальном септальном ядре сопровождалась глиальными изменениями, которые наблюдались в латеральной септальной области и латеральной зоне гиппокампа (Dudas et al., 2004). Этот эффект практически полностью снимался введением 7-β-гидрокси-эпиандростерона.

Активация микроглиальных клеток наблюдалась и после введения иммунотоксина 192-IgG-сапорина. Интрацереброventрикулярное введение 192-IgG-сапорина вызывало увеличение числа микроглиоцитов в базальных ядрах (Rossner et al., 1995). Электронномикроскопическое исследование показало, что микроглиальные клетки располагались вблизи нейронов, окружая своими отростками тела клеток или дендриты (Seeger et al., 1997). При этом активированные микроглиоциты можно было видеть как вблизи нормальных нейронов, так и возле нейронов с признаками дегенерации.

Агрегированный Аβ может активировать микроглию и вызывать ее скопление вокруг амилоидных бляшек. В мозге пациентов активированная микроглия не только перемещается в направлении бляшек, но и фагоцитирует их компоненты, что сопровождается секрецией провоспалительных цитокинов и хемокинов, свободных радикалов и т.д. Прямые доказательства фагоцитоза были получены в экспериментах на крысах (Frautschy et al., 1992). Микроглия может играть роль в деградации Аβ, поскольку содержит практически полный набор необходимых протеаз, включая инсулин-разрушающий фермент, неприлизин, матриксную металлопротеазу-9 (Hickman et al., 2008; Qiu et al., 1997). Параллельно с фагоцитозом Аβ может индуцировать продукцию микроглией активных форм кислорода (Weldon et al., 1998), повышать экспрессию белков основного класса гистосовместимости (MHC II), увеличивать секрецию провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-6, TNFα, а также хемокинов IL-8, воспалительного белка макрофагов MIP1-α и моноцитарного хемоаттрактантного белка MCP-1 (Rogers, Lue, 2001).

Введение Аβ(25-35) в гиппокамп приводит к разрушению близлежащей ткани и дегенерации нейронов (Rush et al., 1992). В то же время, Е.М. Сигурдссон с соавторами (Sigurdsson et al., 1995) не смогли обнаружить нейротоксического действия Аβ(25-35) при введении его в область вентрального бледного шара и безымянной субстанции. Авторы смогли наблюдать лишь образование полостей, содержавших белковые агрегаты, которые окрашивались Конго красным. Те же авторы обнаружили нейродегенеративные изменения после введения Аβ(25-35) в миндалину (Sigurdsson et al., 1996), что может свидетельствовать о специфичности нейротоксических эффектов этого пептида в отношении определенных структур и/или популяций

клеток мозга. Кроме того, в ипсилатеральном гиппокампе наблюдался реактивный астроцитоз (Sigurdsson et al., 1996,1997a). Необходимо отметить также, что микроглия и нейроны экспрессировали провоспалительный фактор IL-1β (Sigurdsson et al., 1997b). Агрегированный пептид Aβ(25-35) вызывал более выраженные повреждения пирамидного слоя поля CA1 гиппокампа по сравнению с пептидом, который был синтезирован из тех же аминокислот в обратной последовательности Aβ(35-25) (Степаничев и др., 2006б; Arias et al., 2002; Montiel et al., 2006; Stepanichev et al., 2003b). Дегенерирующие нейроны были также обнаружены в височной коре после инъекции Aβ(25-35) в крупноклеточное базальное ядро крыс (Манухина и др., 2009). Следует отметить, что введение ундекапептида в отдельные структуры мозга может вызывать развитие транссинаптических нарушений цитоскелета и активацию астроглии и микроглии, т.е. нейровоспалительный ответ, которые распространяются от места непосредственного введения к более отдаленным регионам. Такие изменения наблюдали, например, после введения Aβ(25-35) в миндалину (Sigurdsson et al., 1996). В наших исследованиях Aβ(25-35) также вызывал активацию астроцитов и микроглии в гиппокампе (Stepanichev et al., 2003b). Провоспалительный цитокин-фактор некроза опухоли-α (ФНОα), введенный одновременно с Aβ(25-35), делал повреждающий эффект этого пептида более выраженным (Stepanichev et al., 2003b), тогда как антивоспалительный цитокин IL-4 снижал патологические последствия интрагиппокампальной инъекции Aβ(25-35) (Степаничев и др., 2006а).

Введение агрегированного Aβ(25-35) в латеральные желудочки мозга крыс вызывало интенсификацию свободнорадикальных процессов, которые также сопровождают нейровоспаление. Накопление продуктов перекисного окисления липидов, компенсаторные изменения генерации свободных радикалов и антирадикальной защиты наблюдались прежде всего в гиппокампе (Митрохина и др., 1999; Степаничев и др., 2000, Stepanichev et al., 2004). Изменения параметров окислительного стресса происходили в течение первой недели после введения Aβ(25-35) и становились максимально выраженными через месяц после воздействия. Aβ(25-35) приводил к активации нейрональной NO-синтазы, которая не была связана с изменениями уровня транскрипционной активности или трансляционных процессов (Stepanichev et al., 2008). Эти данные подчеркивают, что даже в отсутствие отложений Aβ в мозге крыс, кратковременная аппликация этого пептида способна вызвать стойкую активацию процессов, в частности нейровоспалений, способных приводить к развитию дегенеративных изменений.

5. Исследование процессов нейрогенеза в инъекционных моделях БА

Возникновение ряда мнестических нарушений может быть связано с изменением процессов нейрогенеза в мозге. Действительно, возрастное снижение нейрогенеза в субвентрикулярной зоне (СВЗ) и субгранулярной зоне (СГЗ) гиппокампа является одной из причин функциональных нарушений памяти (Kuhn et al., 1996; Kempermann et al., 1998, 2002). Исследование нейрогенеза в биопсийном материале,

полученном от больных БА, с использованием маркерных белков дифференцировки показало увеличение экспрессии белков незрелых клеток, таких как даблкортин (Dcx), полисиалилированный белок клеточной адгезии PSA-NCAM, нейрогенный фактор дифференцировки и TUC-4 (Jin et al., 2004b). В то же время, у пациентов с пресенильной стадией БА не было обнаружено усиления пролиферации нейральных предшественников, хотя число глиальных элементов, образованных *de novo*, возрастало (Boekhoorn et al., 2006). Было также установлено, что при БА происходит нарушение механизмов созревания новообразованных нейронов в зубчатой фасции (ЗФ) (Li et al., 2008). В других работах было многократно показано, что при БА пролиферация предшественников и их число существенно снижаются (см. обзоры Hamilton et al., 2013; Lazarov et al., 2010).

Использование нетрансгенных моделей БА также не позволяет сделать определенного заключения относительно влияния разных фрагментов белка-предшественника амилоида на нейрогенез. Так, введение в боковые желудочки мозга мышей Aβ(1-42) или Aβ(25-35) снижало уровень пролиферации клеток в СВЗ в течение последующих 5 дней (Haughey et al., 2002a). Похожие результаты были получены Х. Ли и П. Зу (Li, Zuo, 2005), которые показали, что интрацеребровентрикулярная инъекция Aβ(25-35) сопровождается не только снижением нейрогенеза, но и нейродегенеративными изменениями в гиппокампе. Вместе с тем, увеличение пролиферации клеток в СВЗ также было продемонстрировано у мышей линии B6/DBA после введения Aβ(1-42) (Sotthibundhu et al., 2009). Стимулирующий эффект Aβ(1-42) на стволовые клетки был опосредован активацией рецептора p75NTR. Как видно из приведенных данных, результаты этих немногих работ так же противоречивы, как и полученные на мутантных животных. Практически отсутствуют данные для каких-либо других видов грызунов, кроме мышей.

Следует отметить, что в значительной степени противоречивость получаемых данных может быть обусловлена различиями в используемых авторами методических подходах к детекции процессов нейрогенеза даже на сходных экспериментальных моделях. В первую очередь это связано с различными протоколами введения тимидинового аналога 5'-бромо-2'-дезоксиуридина (BrdU), который чаще всего используется для детекции пролиферации. У людей применение этого подхода невозможно, что затрудняет и без того непростую интерпретацию получаемых результатов. Так, единственное исследование (Jin et al., 2004b), выполненное на материале, полученном от людей, и демонстрирующее увеличение содержания Dcx в гиппокампе при БА, основано только на данных вестерн-блот-анализа, который не позволяет сделать выводов о местоположении и распределении клеток, экспрессирующих этот белок. В то же время, гистологическое исследование в когорте более молодых пациентов с БА позволило сделать вывод о том, что изменения пролиферации в гиппокампе связаны, главным образом, с изменением числа глиальных и эндотелиальных клеток (Boekhoorn et al., 2006).

В нашей работе исследование пролиферации было проведено с использованием многократного введения BrdU в течение 5 дней после инъекции Aβ(25-35) в боковые желудочки мозга крыс (Степаничев и др., 2009). Было установлено, что Aβ(25-35) оказывал влияние на процессы пролиферации клеток и в СВЗ, и в СГЗ, но ха-

рактер этих влияний был различным. В СВЗ число клеток, которые образовались в группе животных, инъецированных этим пептидом, не отличалось от контрольных крыс или крыс, получавших Аβ(35-25), но оставалось более высоким через 12 дней после операции, что может свидетельствовать об усилении пролиферации и/или нарушении миграционных процессов, связанных с действием Аβ(25-35). В СГЗ пролиферация клеток была снижена по сравнению с другими группами животных и через 6, и через 12 дней после операции.

Негативное влияние Аβ(1-42) и Аβ(25-35) при интрацереброventрикулярном введении мышам было замечено в работе (Haughey et al., 2002a) также при субхроническом введении BrdU. Авторы описали этот эффект на качественном уровне при унилатеральном введении 5 нмоль Аβ(1-42) и Аβ(25-35). Они показали также, что аппликация этих пептидов в культуру нейросфер, полученных из эмбриональной ткани, приводила к нарушению пролиферации и нейрональной дифференцировки нейросфер (Haughey et al., 2002a,b), связанному с дисбалансом Ca^{2+}. Следует отметить, что в этой работе авторы использовали существенно меньшую дозу пептидов и более поздние сроки по сравнению с нашим исследованием. В то же время, был обнаружен стимулирующий пролиферацию нейросфер эффект Аβ(1-42) в культуре, полученной из СВЗ (Lopez-Toledano, Shelanski, 2004; Sotthibundhu et al., 2009). Предполагают, что эти эффекты обусловлены активацией рецептора p75NTR.

Можно предположить, что стимулирующий эффект Аβ связан с длительным воздействием на относительно многочисленную популяцию делящихся клеток, которая включает в себя как непосредственно стволовые клетки, так и незрелые пролиферирующие нейробласты. Для того чтобы исследовать эффекты Аβ(25-35) на более однородную по составу группу клеток, была использована иная схема введения BrdU, при которой этот предшественник вводили крысам только в течение первых суток после инъекции Аβ(25-35). Иммуногистохимическая детекция включившегося BrdU была проведена через 6, 12 и 28 дней после инъекций Аβ(25-35) или растворителя. Было установлено, что общее число $BrdU^+$-клеток в СВЗ у контрольных крыс при такой схеме введения было меньше, чем в предыдущей серии экспериментов, и на протяжении всего времени наблюдения не подвергалось существенному изменению. В то же время, через 6 дней после введения Аβ(25-35) число новых клеток было значительно увеличено. Число $BrdU^+$-клеток не отличалось достоверно от контрольного уровня уже через 12 дней после операции, но все еще оставалось весьма высоким. Это также свидетельствует в пользу предположения о том, что Аβ(25-35) не только усиливает пролиферацию в СВЗ, но и снижает скорость миграции новых клеток по ростральному миграционному пути.

Иная картина изменений наблюдается при исследовании пролиферации и созревания клеток в СГЗ. Так, при субхроническом введении BrdU наблюдалось существенное снижение числа $BrdU^+$-клеток в СГЗ ЗФ мозга крыс как через 6, так и через 12 дней после инъекции Аβ(25-35) по сравнению с контролем или пептидом Аβ(35-25). Тем не менее, при исследовании популяции «новых» клеток, образовавшихся через 1 день после операции, нам не удалось выявить каких-либо различий в числе $BrdU^+$-клеток ни на одном из исследованных сроков. В то же время, Аβ(25-35) существенно изменял характер созревания клеток. Так, через 28 дней после инъек-

ции Aβ(25-35) доля $BrdU^+$-клеток, экспрессировавших маркер незрелых нейронов Dcx, была значительно выше в этой группе крыс по сравнению с контролем. Кроме того, доля $BrdU^+$-клеток, экспрессировавших маркер зрелых нейронов NeuN, была достоверно ниже по сравнению с контролем.

Для того чтобы понять, какие механизмы могут быть задействованы в опосредовании эффектов Aβ(25-35), необходимо кратко упомянуть об основных процессах, контролирующих нейрогенез. Наши представления об этих процессах в основном базируются на исследованиях механизмов деления клеток и экспрессии маркеров нейробластов. Стволовые клетки и предшественники делятся в специфическом микроокружении нейрогенной ниши. Нейроны ЗФ получают возбуждающую глутаматергическую иннервацию из энторинальной коры, а ГАМК-ергическая тормозная иннервация обеспечивается интернейронами самой ЗФ. Помимо этого нейроны ЗФ получают входы из разных отделов мозга, передача сигнала в которых опосредована различными медиаторными системами (Андреева и др., 1985; Гасанов, Меликов, 1986; Отмахов, 1993; Lie et al., 2004). Наиболее исследована роль глутамата и ГАМК в контроле деления и дифференцировки клеток в СГЗ ЗФ. Считается, что глутаматная трансмиссия, опосредованная NMDA-рецепторами, обратно коррелирует с уровнем пролиферации в гиппокампе (Lie et al., 2004). В то же время, сами нейробласты не экспрессируют NR1-субъединицу NMDA-рецепторов, играющую ведущую роль в нейротрансмиссии (Deisseroth et al., 2004), однако эти клетки деполяризуются в ответ на аппликацию ГАМК, а, кроме того, ГАМК-ергическая стимуляция способствует дифференцировке гиппокампальных предшественников типа 2 (Tozuka et al., 2005). По-видимому, ГАМК играет более выраженную роль в процессах пролиферации и дифференцировки новых клеток в СГЗ гиппокампа как в обычных условиях, так и в условиях патологии (Аниол, Степаничев, 2007; Deisseroth, Malenka, 2005). Кроме того, пептидные нейромедиаторы также могут оказывать влияние на нейробласты СВЗ и СГЗ (Lie et al., 2004).

Нейральные стволовые клетки, подобно стволовым клеткам из других органов и тканей, экспрессируют рецепторы к большому набору ростовых факторов, что свидетельствует о возможной регуляции пролиферации этих клеток такими молекулами. На сегодняшний день получены свидетельства того, что практически все известные ростовые факторы в той или иной мере обладают способностью воздействовать на нейрогенез. Например, повышение уровня BDNF в нейрогенных областях приводит к усилению пролиферации предшественников (Benraiss et al., 2001). Установлено, что пролиферация клеток, взятых из субвентрикулярной области *in vitro*, требует наличия нескольких ростовых факторов (Reynolds, Weiss, 1992). К их числу, наряду с уже упомянутым BDNF, относятся эпидермальный фактор роста (EGF) и основный фактор роста фибробластов (bFGF). Предполагается, что эти же ростовые факторы стимулируют нейрогенез *in vivo* (Kuhn et al., 1997; Doetsch et al., 2002).

Можно предположить, что отрицательное влияние Aβ на пролиферацию клеток связано с нарушением трофического обеспечения. Так, установлено, что агрегированный Aβ негативно влияет на уровень BDNF у трансгенных мышей (Peng et al., 2009). Введение Aβ(1-42) в мозг крыс также приводит к снижению содержания

этого нейротрофина (Christensen et al., 2008). С другой стороны, длительное введение Aβ(1-42), Aβ(1-40) или Aβ(25-35) приводило к увеличению экспрессии BDNF (Tang et al., 2000).

Клетки пролиферативных областей мозга могут находиться под влиянием и других внешних факторов, среди которых хотелось бы особо остановиться на воздействии свободных радикалов. ГАМК-ергические нейроны Аммонова рога и ЗФ могут служить источником NO. При этом оказывается, что области, богатые нитрергическими нейронами, анатомически тесно связаны с областями интенсивного нейрогенеза. Такое наблюдение справедливо как для гиппокампа, где нитрергические нейроны гранулярного слоя и хилуса находятся в непосредственной близости от пролиферирующих клеток СГЗ ЗФ (Estrada, Murillo-Carretero, 2005), так и для СВЗ (Moreno-López et al., 2000). Последняя богата аксонами нитрергических нейронов, образующими здесь густую сеть, в петлях которой расположены кластеры пролиферирующих нейробластов. Отростки нейронов, экспрессирующих nNOS, наблюдаются также и на всей протяженности ростального миграционного русла, где они тесно переплетаются с цепочками пролиферирующих и мигрирующих клеток. В самих нейробластах, мигрирующих от субвентрикулярной области, экспрессии nNOS не отмечается, и лишь в некоторых клетках, уже достигших гранулярного и перигломерулярного слоев обонятельной луковицы, начинает экспрессироваться nNOS. Указанные области обонятельной луковицы являются местами, где происходит дифференцировка нейральных предшественников, что, по мнению Е.Р. Матарредона и др. (Matarredona et al., 2004), может говорить как о дифференцировке нейральных предшественников в нитрергические нейроны, так и о временной экспрессии nNOS в процессе дифференцировки нейронов. Все это позволяет задуматься о возможном участии нитрергических механизмов в регуляции процессов нейрогенеза не только на ранних этапах онтогенеза (Santacana et al., 1998; Peunova et al., 2001), но и в мозге взрослых животных (Moreno-Lopez et al., 2000). Также известно, что NO подавляет пролиферацию многих типов клеток *in vitro* (Murillo-Carretero et al., 2002), при этом блокируя пролиферативные эффекты некоторых ростовых факторов, в частности EGF. NO подавляет пролиферацию предшественников нейронов в СВЗ (Moreno-Lopez et al., 2000). При этом авторам не удалось наблюдать аналогичного эффекта в ЗФ. А. Ченг и др. (Cheng et al., 2003) установили, что система NO участвует в механизме действия BDNF на дифференцировку нейральных предшественников. В частности, было показано, что BDNF повышает экспрессию nNOS в предшественниках нейронов в СВЗ, останавливая их пролиферацию и запуская дифференцировку, а ингибирование nNOS блокирует дифференцирующее действие BDNF.

В настоящее время остается неясным, как на молекулярном уровне NO оказывает свое антипролиферативное и дифференцирующее действие. С.Р. Джеффри с соавторами (Jaffrey et al., 2001) полагают, что в качестве такого механизма выступает осуществляемое NO нитрозилирование –SH групп цистеиновых остатков различных рецепторных и регуляторных белков с образованием нитрозотиолов, что приводит к изменению активности белков-мишеней. В подтверждение этой концепции авторы работы (Murillo-Carretero et al., 2002) показали, что NO может обра-

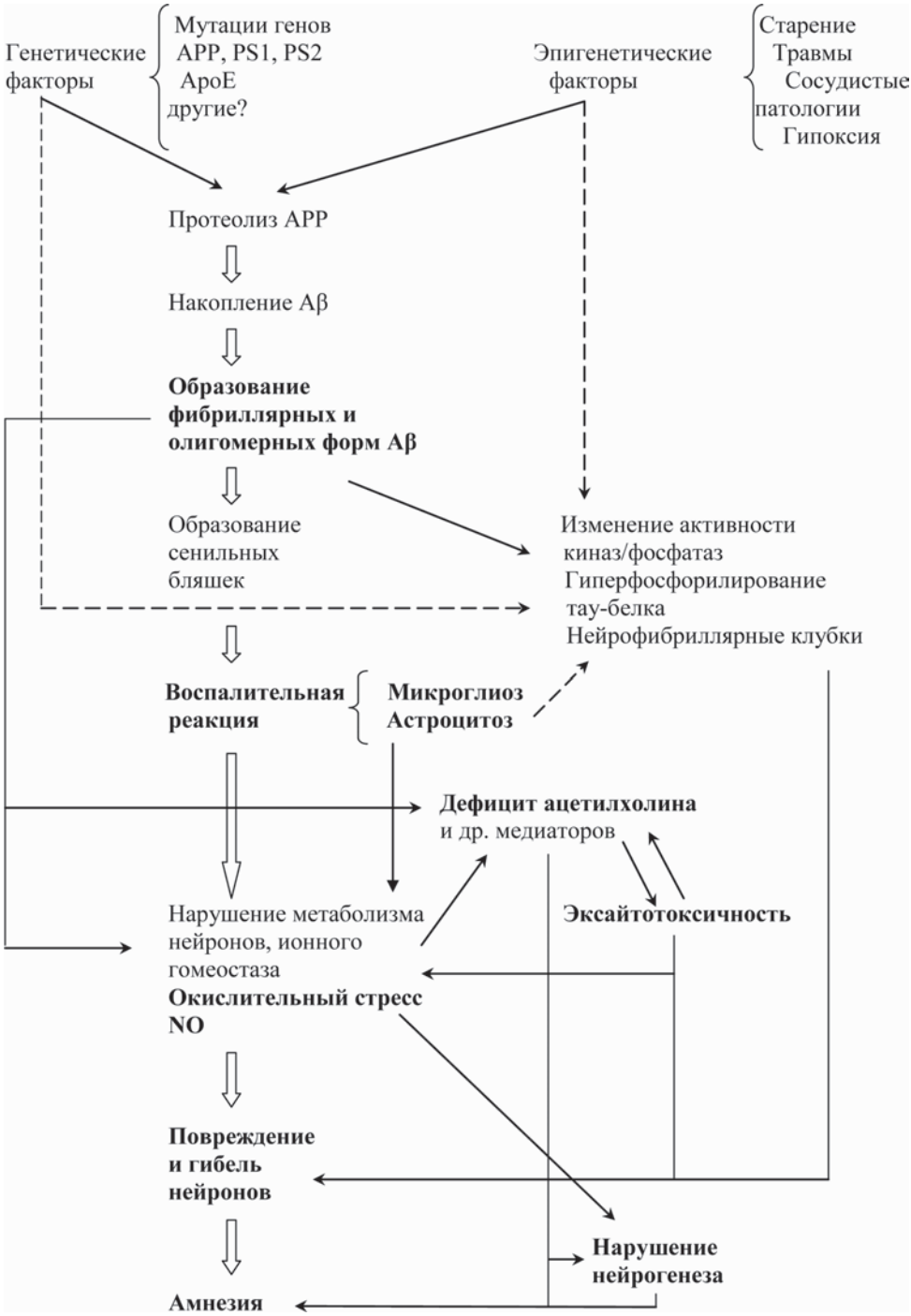


Рис. 1. Гипотетическая схема событий, ведущих к возникновению амнезии альцгеймеровского типа

Жирным шрифтом выделены процессы, развитие которых можно наблюдать в так называемой «амилоидной» модели БА

тимо нитрозилировать рецептор EGF. Рецептор EGF представляет собой мембранную тирозинкиназу, димеризующуюся при связывании EGF и взаимно фосфорилирующуюся по остаткам тирозина. Воздействие NO приводит к ингибированию реакции фосфорилирования рецептора EGF, а также к замедлению пролиферации, вызванной EGF.

Можно предположить, что помимо NO и другие свободные радикалы и метаболиты окислительного стресса могут оказывать воздействие на обсуждаемые процессы. Например, аппликация Aβ(1-40) в культуру стволовых клеток человека приводила к увеличению в них содержания карбонильных групп в белках и продуктов ПОЛ (Mazur-Kolecka et al., 2006). Окислительный стресс, вызванный радиоактивным облучением (Fishman et al., 2009) или экспозицией в атмосфере, обогащенной озоном (Rivas-Arancibia et al., 2010), ведут к угнетению нейрогенеза. В пользу этого свидетельствует также подавление нейрогенеза в результате эмоционального стресса (Heine et al., 2005; Dagyte et al., 2009). Известно, что и острый, и хронический эмоциональный стресс сопровождаются изменениями свободнорадикального окисления (Айрапетянц и др. 2006) и в ряде случаев повреждением нейронов гиппокампа (Тишкина и др., 2009). Возможно, что дополнительный негативный эффект стресса на нейрогенез связан с выбросом стрессорных гормонов в кровь (Fuchs et al., 2001). Косвенным свидетельством того, что свободные радикалы до определенной степени могут контролировать и/или изменять процессы пролиферации клеток в мозге, является ее усиление вследствие двигательной активности (Van Praag et al., 1999a,b). Было показано, что умеренная физическая нагрузка повышает антиоксидантную защиту организма в целом (Gomez-Cabrera et al., 2008) и мозга в частности (Radak et al., 2007), и снижает вероятность возникновения БА (Radak et al., 2010). Таким образом, окислительный стресс, вызываемый в гиппокампе введением Aβ(25-35) в боковые желудочки, может быть одной из причин угнетения пролиферации и замедления дифференцировки в СГЗ ЗФ.

6. Заключение

В последнее десятилетие был сделан существенный вклад в понимание нейропатологии и механизмов клеточных и биохимических нарушений, связанных с БА. Одновременно с этим были предприняты шаги к разработке моделей этого заболевания на животных. Несмотря на отсутствие в настоящий момент «идеальной модели» БА, которая позволяла бы воспроизвести все нейропатологические и клинические аспекты болезни, разработанные в экспериментах подходы к моделированию позволяют использовать имеющиеся модели для поиска новых путей терапии БА. Необходимым условием для этого является понимание тех аспектов, которые имеющиеся модели позволяют воспроизводить. Базируясь на имеющихся данных литературы и собственных исследованиях, можно изобразить совокупность событий, протекающих в мозге при развитии нейродегенеративного процесса, сопровождающего БА, в виде схемы (рис. 1). На ней изображены основные этапы патогенеза этого заболевания, часть из которых воспроизводится в модели амнезии

альцгеймеровского типа, исследованной с применением интрацеребрального введения разных фрагментов Аβ, включая наши исследования с пептидом Аβ(25-35). Подытоживая, следует отметить, что безусловным преимуществом относительно «простых» фармакологических моделей, о которых шла речь в настоящем разделе, является наличие гибели холинергических нейронов. По-видимому, одним из ведущих механизмов запуска и/или реализации этой гибели является окислительный стресс. Позволит ли это выработать новые подходы к обеспечению антирадикальной защиты холинергических нейронов, которые способствовали бы их выживанию в условиях окислительного стресса в ходе развития БА, покажет ближайшее будущее.

Литература

Айрапетянц М.Г., Яковлев А.А., Лазарева Н.А. и др. Исследование механизмов, опосредующих гибель нейронов, при хроническом стрессе у крыс // Нейрохимия. 2006. Т. 23. № 2. С. 136-142.

Андреева Н.Г., Обухов Д.К., Демьяненко Г.П., Каменская В.Г. Морфология нервной системы. Л.: ЛГУ, 1985. С. 160.

Аниол В.А., Степаничев М.Ю. Оксид азота (II) и гамма-аминомасляная кислота как регуляторы нейрогенеза в мозге взрослых млекопитающих при моделировании судорожной активности // Нейрохимия. 2007. Т. 24. № 4. С. 279-289.

Гасанов Г.Г., Меликов Э.М. Нейрохимические механизмы гиппокампа, тета-ритм и поведение. М.: Наука, 1986. С. 184.

Гордон Р.Я., Макарова Е.Г., Подольский И.Я. и др. Нарушение белкового синтеза – раннее проявление действия амилоида-β в нейронах // Нейрохимия. 2012. Т. 29. № 2. С. 139-150.

Манухина Е.Б., Горячева А.В., Барсков И.В. и др. Предупреждение нейродегенеративного повреждения мозга крыс при экспериментальной болезни Альцгеймера с помощью адаптации к гипоксии // Рос. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2009. Т. 95. № 7. С. 706-715.

Митрохина О.С., Степаничев М.Ю., Лазарева Н.А и др. Влияние интрацереброventрикулярного введения фрагмента (25-35) бета-амилоидного пептида на перекисное окисление липидов в отделах мозга и крови крыс // Докл. РАН. 1999. Т. 368. С. 711-713.

Моисеева Ю.В., Онуфриев М.В., Лазарева Н.А., Степаничев М.Ю., Гуляева Н.В. Свободнорадикальные механизмы септо-гиппокампальной нейродегенерации, вызванной холинотоксином AF64A у крыс in vivo // Нейрохимия. 2001. Т. 18. С. 287-289.

Муганцева Е.А., Подольский И.Я. Центральное введение амилоидного β-пептида (25-35) и индивидуальные различия когнитивного поведения у крыс // ЖВНД. 2009. Т. 59. № 5. С. 616-621.

Отмахов Н.А. Нейрональная сеть гиппокампа // Успехи физиол. наук. 1993. Т. 24. № 4. С. 79-101.

Пшенникова М.Г., Попкова Е.В., Хоменко И.П и др. Устойчивость к нейродегенеративному повреждению мозга у крыс Август и Вистар // Бюлл. эксперим. биол. мед. 2005. Т. 139. С. 540-542.

Степаничев М.Ю., Лазарева Н.А., Онуфриев М.В. и др. Влияние введения фрагмента (25-35) β-амилоидного пептида на поведение крыс // ЖВНД. 1997. Т. 47. С. 597-600.

Степаничев М.Ю., Онуфриев М.В., Митрохина О.С. и др. Нейрохимические, поведенческие и нейроморфологические эффекты центрального введения бета-амилоидного пептида (25–35) у крыс // Нейрохимия. 2000. Т. 17. № 4. С. 291.

Степаничев М.Ю., Здобнова И.М., Зарубенко И.И., Лазарева Н.А., Гуляева Н.В. Исследование эффектов центрального введения β-амилоидного пептида (25-35): патоморфологические изменения в гиппокампе и нарушение пространственной памяти // ЖВНД. 2004а. Т. 54. С. 705-711.

Степаничев М.Ю., Моисеева Ю.В., Лазарева Н.А., Гуляева Н.В. Исследование эффектов фрагмента (25-35) β-амилоидного пептида на поведение крыс в радиальном лабиринте // ЖВНД. 2004б. Т. 54. С. 382-389.

Степаничев М.Ю., Флегонтова О.В., Лазарева Н.А., Егорова Л.К., Гуляева Н.В. Влияние противовоспалительного цитокина интерлейкина-4 на нейродегенерацию у крыс, вызванную бета-амилоидным пептидом // Нейрохимия. 2006а. Т. 23. № 1. С. 67-72.

Степаничев М.Ю., Онуфриев М.В., Моисеева Ю.В. и др. Влияние фактора некроза опухоли-альфа и бета- амилоидного пептида (25-35) на показатели свободнорадикального окисления и активность каспазы-3 в мозге крыс // Нейрохимия. 2006б. Т. 23. № 3. С. 217- 222.

Степаничев М.Ю., Либе М.Л., Чернышевская И.А., Мойсеенок А.Г., Гуляева Н.В. Экспрессия НАДФН-диафоразы в мозге крыс в отдаленные сроки после введения холинотоксина AF64A // Нейрохимия. 2007. Т. 24. С. 161-165.

Степаничев М.Ю., Моисеева Ю.В., Лазарева Н.А., Онуфриев М.В., Гуляева Н.В. Изменения пролиферации клеток в субвентрикулярной зоне мозга у взрослых крыс при введении β-амилоидного пептида (25-35). Морфология. 2009. Т. 135. № 1. С. 13-16.

Степанов И.И., Кузнецова Н.Н., Климентьев Б.И., Сапронов Н.С. Влияние интрацеребровентрикулярного введения бета-амилоида на динамику обучения у крыс Вистар и нелинейных крыс // Росс. физиол. журнал. 2006. Т. 92. С. 449-460.

Тишкина А.О., Левшина И.П., Лазарева Н.А. и др. Хронический стресс вызывает неапоптотическую гибель нейронов в гиппокампе крыс // Докл. РАН. 2009. Т. 428. № 1. С. 130-134.

Abe E., Murai S., Masuda Y., Saito H., Itoh T. Alpha-sialyl cholesterol reverses AF64A-induced deficit in passive avoidance response and depletion of hippocampal acetylcoline in mice // Br. J. Pharmacol. 1993. Vol. 108. P. 387-392.

Akiyama H., Barger S., Barnum S. et al. Neuroinflammation Working Group. Inflammation and Alzheimer's disease // Neurobiol. Aging. 2000. Vol. 21. P. 383-421.

Arendt T., Holzer M., Gärtner U. Neuronal expression of cycline dependent kinase inhibitors of the INK4 family in Alzheimer's disease // J. Neural. Transm. 1998. Vol. 105. P. 949-60.

Arias C., Montiel T., Quiroz-Báez R., Massieu L. beta-Amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus in vivo and in isolated nerve terminals: implications for Alzheimer's disease // Exp. Neurol. 2002. Vol. 176. P. 163-174.

Bailey E.L., Overstreet D.H., Crocker A.D. Effects of intrahippocampal injections of the cholinergic neurotoxin AF64A on open-field activity and avoidance learning in the rat // Behav. Neural Biol. 1986. Vol. 45. P. 263-274.

Baxter M.G., Bucci D.J., Gorman L.K., Wiley R.G., Gallagher M. Selective immunotoxic lesions of basal forebrain cholinergic cells: effects on learning and memory in rats // Behav. Neurosci. 1995. Vol. 109. № 4. P. 714-22.

Baxter M.G., Bucci D.J., Sobel T.J., Williams M.J., Gorman L.K., Gallagher M. Intact spatial learning following lesions of basal forebrain cholinergic neurons // Neuroreport. 1996. Vol. 7. № 8. P. 1417-20.

Benraiss A., Chmielnicki E., Lerner K. et al. Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain // J. Neurosci. 2001. Vol. 21. P. 6718-6731.

Berrard S., Varoqui H., Cervini R. et al. Coregulation of two embedded gene products, choline acetyltransferase and the vesicularacetylcholine transporter // J. Neurochem. 1995. Vol. 65. № 2. P. 939-942.

Boekhoorn K., Joels M., Lucassen P.J. Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus // Neurobiol. Dis. 2006. Vol. 24. P. 1-14.

Braak H., Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes // Acta. Neuropathol. 1991. Vol. 82. P. 239-259.

Brandeis R., Pittel Z., Lachman C. et al. AF64A-induced cholinotoxicity: Behavioral and biochemical correlates // Alzheimer's and Parkinson's Disease: Strategies for Research and Development. Ed. A. Fisher et al. NY: Plenum Press, 1986. P. 469-478.

Brown N.H. Integrins as mediators of morphogenesis in Drosophila // Dev. Biol. 2000. Vol. 223. P. 1-16.

Chen S.Y., Harding J.W., Barnes C.D. Neuropathology of synthetic beta-amyloid peptide analogs in vivo // Brain Res. 1996a. Vol. 715. P. 44-50.

Chen S.Y., Wright J.W., Barnes C.D. The neurochemical and behavioral effects of beta-amyloid peptide (25-35) // Brain Res. 1996b. Vol. 720. P. 54-60.

Cheng A., Wang S., Cai J. et al. Nitric oxide acts in a positive feedback loop with BDNF to regulate neural progenitor cell proliferation and differentiation in the mammalian brain // Dev. Biol. 2003. Vol. 258. P. 319-333.

Christensen R., Marcussen A.B., Wörtwein G. et al. Abeta(1-42) injection causes memory impairment, lowered cortical and serum BDNF levels, and decreased hippocampal 5-HT(2A) levels // Exp. Neurol. 2008. Vol. 210. P. 164-171.

Chrobak J.J., Hanin I., Schmechel D.E., Walsh T.J. AF64A-induced working memory impairment: behavioral, neurochemical and histological correlates // Brain Res. 1988. Vol. 463. P. 107-117.

Chrobak J.J., Spates M.J., Stackman R.W., Walsh T.J. Hemicholinium-3 prevents the working memory impairments and the cholinergic hypofunction induced by ethylcholine aziridinium ion (AF64A) // Brain Res. 1989. Vol. 504. P. 269-275.

Coyle J.T., Price D.L., DeLong M.R. Alzheimer's disease: a disorder of central cholinergic innervation // Science. 1983. V. 219. P. 1184-1190.

Dagyte G., Van der Zee E.A., Postema F. et al. Chronic but not acute foot-shock stress leads to temporary suppression of cell proliferation in rat hippocampus // Neuroscience. 2009. Vol. 162. P. 904-913.

Deisseroth K., Singla S., Toda H. et al. Excitation-neurogenesis coupling in adult neural stem/progenitor cells // Neuron. 2004. Vol. 42. P. 535-552.

Deisseroth K., Malenka R.C. GABA excitation in the adult brain: a mechanism for excitation- neurogenesis coupling // Neuron. 2005. Vol. 47. P. 775-777.

Delobette S., Privat A., Maurice T. In vitro aggregation facilities beta-amyloid peptide-(25-35)-induced amnesia in the rat // Eur. J. Pharmacol. 1997. Vol. 319. P. 1-4.

Dineley K.T., Kayed R., Neugebauer V., Fu Y., Zhang W., Reese L.C. et al. Amyloid-beta oligomers impair fear conditioned memory in a calcineurin-dependent fashion in mice // J. Neurosci. Res. 2010. Vol. 88. P. 2923-32.

Ding Q., Markesbery W.R., Chen Q., Li F., Keller J.N. Ribosome dysfunction is an early event in Alzheimer's disease // J. Neurosci. 2005. Vol. 25. P. 9171-9175.

Doetsch F., Petreanu L., Caille I. et al. EGF converts transit-amplifying neurogenic precursors in the adult brain into multipotent stem cells // Neuron. 2002. Vol. 36. P. 1021-1034.

Dudas B, Hanin I, Rose M, Wülfert E. Protection against inflammatory neurodegeneration and glial cell death by 7beta-hydroxy epiandrosterone, a novel neurosteroid // Neurobiol. Dis. 2004. Vol. 15. № 2. P. 262-268.

Emerich D.F., Black B.A., Kesslak J.P. et al. Transplantation of fetal cholinergic neurons into the hippocampus attenuates the cognitive and neurochemical deficits induced by AF64A // Brain Res. Bull. 1992. Vol. 28. P. 219-226.

Emerich D.F., Walsh T.J. Ganglioside AGF2 promotes task- specific recovery and attenuates the cholinergic hypofunction induced by AF64A // Brain Res. 1990. Vol. 572. P. 299-307.

Estrada C., Murillo-Carretero M. Nitric oxide and adult neurogenesis in health and disease // Neuroscientist. 2005. Vol. 11. P. 294-307.

Eva C., Fabrazzo M., Costa E. Changes of cholinergic, noradrenergic and serotonergic synaptic transmission indices by ethylcholine aziridinium ion (AF64A) infused intraventricularly // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1987. Vol. 222. P. 181-186.

Fishman K., Baure J., Zou Y. et al. Radiation-induced reductions in neurogenesis are ameliorated in mice deficient in CuZnSOD or MnSOD // Free Radic. Biol. Med. 2009. Vol. 47. P. 1459-1467.

Flood J.F., Morley J.E., Roberts E. Amnesic effects in mice of four synthetic peptides homologous to amyloid β protein from patients with Alzheimer disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. Vol. 88. P. 3363-3366.

Flood J.F., Morley J.E., Roberts E. An amyloid β protein fragment, Aβ[12-28], equipotently impairs post-training memory processing when injected into different limbic system structures // Brain Res. 1994. Vol. 663. P. 271-276.

Francis P.T., Simus N.R., Procter A.W., Bowen D.M. Cortical pyramidal neurone loss may cause glutamatergic hypoactivity and cognitive impairment in Alzheimer's disease: investigative and therapeutic perspectives // J. Neurochem. 1993. Vol. 60. P. 1589-1604.

Frautschy S.A., Cole G. M., Baird A. Phagocytosis and deposition of vascular beta-amyloid in rat brains

injected with Alzheimer's beta-amyloid // Am. J. Pathol. 1992. Vol. 140. P. 1389-1399.
Fuchs E., Flügge G., Ohl F. et al. Psychosocial stress, glucocorticoids, and structural alterations in the tree shrew hippocampus // Physiol. Behav. 2001. Vol. 73. P. 285-291.
Games D., Khan K.M., Soriano F.G. et al. Lack of Alzheimer pathology after beta-amyloid protein injections in rat brain // Neurobiol. Aging. 1992. Vol. 13. P. 569-576.
Geula C., Wu C.-K., Saroff D. et al. Aging renders the brain vulnerable to amyloid b-protein neurotoxicity // Nat. Med. 1998. Vol. 4. P. 827- 831.
Giovannelli L., Casamenti F., Scali C., Bartolini L., Pepeu G. Differential effects of amyloid peptides β-(1-40) and β-(25-35) injections into the rat nucleus basalis // Neuroscience. 1995. Vol. 66. P. 781-792.
Gomez-Cabrera M.C., Domenech E., Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training // Free Radic. Biol. Med. 2008. Vol. 44. P. 126-131.
Gulyaeva N.V., Lazareva N.A., Libe M.L. et al. Oxidative stress in the brain following intraventricular administration of ethylcholine aziridinium (AF64A) // Brain Res. 1996. Vol. 726. P. 174-180.
Gulyaeva N.V., Victorov I.V., Stepanichev M.Yu. et al. Intracerebroventricular administration of beta-amyloid peptide (25-35) induces oxidative stress and neurodegeneration in rat brain // Progress in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Eds. A. Fisher et al. NY: Plenum Press, 1997. P. 89-98.
Gulyaeva N.V., Victorov I.V., Stepanichev M.Yu. et al. Intracerebroventricular administration of beta-amyloid peptide (25-35) induces oxidative stress and neurodegeneration in rat brain // Progress in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Eds. A. Fisher et al. NY: Plenum Press. 1998. P. 89-98.
Hamilton L.K., Joppé S.E., Cochard M.L., Fernandes K.J. Aging and neurogenesis in the adult forebrain: what we have learned and where we should go from here // Eur. J. Neurosci. 2013. Vol. 37. № 12. P. 1978-1986.
Hanin I. The AF64A model of cholinergic hypofunction: an update // Life Sci. 1996. Vol. 58. P. 1955-1964.
Hanin I. Molecular mechanisms of AF64A toxicity in the cholinergic neuron // Progress in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Eds. A. Fisher et al. NY, London: Plenum press, 1997. P. 675-680.
Hanin A., Fisher A., Hortnagl H. et al. Ethylcholine aziridinium (AF64A; ECMA) and other potential cholinergic neuron-specific neurotoxins // Psychopharmacology: The Third Generation of Progress. Ed. H.Y. Meltzer. NY: Raven press, 1987. P. 341-349.
Harkany T., O'Mahony S., Kelly J.P. et al. Beta-amyloid(Phe(SO3H)24)25-35 in rat nucleus basalis induces behavioral dysfunctions, impairs learning and memory and disrupts cortical cholinergic innervation // Behav. Brain Res., 1998. Vol. 90. P. 133-145.
Harkany T., Mulder J., Sasvari M. et al. N-Methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 and radical scavengers protect cholinergic nucleus basalis neurons against beta-amyloid neurotoxicity // Neurobiol. Dis. 1999. Vol. 6. P. 109-121.
Haughey N.J., Liu D., Nath A. et al. Disruption of neurogenesis in the subventricular zone of adult mice, and in human cortical neuronal precursor cells in culture, by amyloid beta-peptide: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease // Neuromolec. Med. 2002a. Vol. 1. P. 125-135.
Haughey N.J., Nath A., Chan S.L. et al. Disruption of neurogenesis by amyloid beta-peptide, and perturbed neural progenitor cell homeostasis, in models of Alzheimer's disease // J. Neurochem. 2002b. Vol. 83. P. 1509-1524.
Heine V.M., Zareno J., Maslam S. et al. Chronic stress in the adult dentate gyrus reduces cell proliferation near the vasculature and VEGF and Flk-1 protein expression // Eur. J. Neurosci. 2005. Vol. 21. P. 1304-1314.
Hickman S.E., Allison E.K., El Khoury J. Microglial dysfunction and defective beta-amyloid clearance pathways in aging Alzheimer's disease mice // J. Neurosci. 2008. Vol. 28. P. 8354-8360.
Hoozemans J.J., Brückner M.K., Rozemuller A.J. et al. Cyclin D1 and cyclin E are co-localized with cyclooxygenase 2 (COX-2) in pyramidal neurons in Alzheimer disease temporal cortex // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2002. Vol. 61. P. 678-688.
Icard-Liepkalns C., Berrard S., Faucon Biguet N. et al. Tyrosine hydroxylase regulation in neurotransmission and neuroplasticity // J. Physiol. Paris. 1993. Vol. 87. № 3. P. 153-157.
Jaffrey S.R., Erdjument-Bromage H., Ferris C.D. et al. Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide // Nat. Cell Biol. 2001. Vol. 3. P. 193-197.
Jarrard L.E., Levy A., Meyerhoff J.L., Kant G.J. Intracerebral injections of AF64A: an animal model of Alzheimer's disease? // Ann. NY Acad. Sci. 1985. Vol. 444. P. 520-522.

Jin C.H., Shin E.J., Park J.B., Jang C.G. et al. Fustin flavonoid attenuates beta-amyloid (1-42)-induced learning impairment // J. Neurosci. Res. 2009. Vol. 87. P. 658-670.
Jin K., Galvan V., Xie L. et al. Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APPSw,Ind) mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004a. Vol. 101. P. 13363-13367.
Jin K., Peel A. L., Mao X. O. et al. Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2004b. Vol. 101. № 1. P. 343-347.
Kempermann G., Kuhn H.G., Gage F.H. Experience-induced neurogenesis in the senescent dentate gyrus // J. Neurosci. 1998. Vol. 18. P. 3206-3212.
Kempermann G., Gast D., Gage F.H. Neuroplasticity in old age: sustained fivefold induction of hippocampal neurogenesis by long-term environmental enrichment // Ann. Neurol. 2002. Vol. 52. V. 135-143.
Klementiev B., Novikova T., Novitskaya V. et al. A neural cell adhesion molecule-derived peptide reduces neuropathological signs and cognitive impairment induced by Abeta25-35 // Neuroscience. 2007. Vol. 145. P. 209-224.
Kowall N., McKee A., Yankner B., Beal M.F. In vivo neurotoxicity of beta-amyloid [beta(1-40)] and the beta(25-35) fragment // Neurobiol. Aging. 1992. Vol. 13. P. 537-542.
Krstic D., Knuesel I. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease // Nat. Rev. Neurol. 2013. Vol. 9. P. 25-34.
Kuhn H.G., Dickinson-Anson H., Gage F.H. Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation // J. Neurosci. 1996. Vol. 16. P. 2027-2033.
Kuhn H.G., Winkler J., Kempermann G. et al. Epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2 have different effects on neural progenitors in the adult rat brain // J. Neurosci. 1997. Vol. 17. P. 5820-5829.
Kuwagata Y, Inoue H. Effects of estrogen on AF64A-induced apoptosis in NG108-15 cells // Brain Res. 2009. Vol. 1297. P. 9-16.
Lautenshlager M., Arnswald A., Freyer D. et al. The AF64A Model of cholinergic hypofunction: Role of nitric oxide in AF64A-mediated neurodegeneration // Progress in Alzheimer's and Parkinson's Diseases. / Eds. Fisher A. et al. NY, London: Plenum press, 1997. P. 681-686.
Lautenschlager M., Onufriev M.V., Gulyaeva N.V. et al. Role of nitric oxide in the ethylcholine aziridinium model of delayed apoptotic neurodegeneration in vivo and in vitro // Neuroscience. 2000. Vol. 97. P. 383-393.
Lazarov O., Mattson M.P., Peterson D.A., Pimplikar S.W., van Praag H. When neurogenesis encounters aging and disease. // Trends Neurosci. 2010. Vol. 33. № 12. P. 569-579.
Lazo O.M., Mauna J.C., Pissani C.A., Inestrosa N.C., Bronfman F.C. Axotomy-induced neurotrophic withdrawal causes the loss of phenotypic differentiation and downregulation of NGF signalling, but not death of septal cholinergic neurons // Mol. Neurodegener. 2010. Vol. 5. P. 5.
Li X., Zuo P. Effects of Abeta25-35 on neurogenesis in the adult mouse subventricular zone and dentate gyrus // Neurol. Res. 2005. Vol. 27. P. 218-222.
Li B., Yamamori H., Tatebayashi Y. et al. Failure of neuronal maturation in Alzheimer disease dentate gyrus // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2008. Vol. 67. P. 78-84.
Lie D.C., Song H., Colamarino S.A. et al. Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2004. Vol. 44. P. 399-421.
Lim D.K., Oh Y.H., Kim H.S. Impairments of learning and memory following intracerebroventricular administration of AF64A in rats // Arch. Pharm. Res. 2001. Vol. 24. № 3. P. 234-239.
Lopez-Toledano M.A., Shelanski M.L. Neurogenic effect of β-amyloid peptide in the development of neural stem cells // J. Neurosci. 2004. Vol. 24. P. 5439-5444.
Lorens S.K., Kindel G, Dong X.W. et al. Septal choline acetyltransferase immunoreactive neurons: dose-dependent effects of AF64A // Brain Res. Bull. 1991. Vol. 26. P. 965-971.*Malik B., Currais A., Soriano S.* Cell cycle-driven neuronal apoptosis specifically linked to amyloid peptide Abeta1-42 exposure is not exacerbated in a mouse model of presenilin-1 familial Alzheimer's disease // J. Neurochem. 2008. Vol. 106. P. 912-6.
Mallet J., Houhou L., Pajak F., Oda Y., Cervini R., Bejanin S., Berrard S. The cholinergic locus: ChAT and VAChT genes. // J. Physiol. Paris. 1998. Vol. 92. № 2. P. 145-147.
Mannisto P.T., Tuomainen P., Kutepova O. et al. Effects of bilateral cholinotoxin infusions on the behavior and brain biochemistry oh the rats // Pharmacol. Biochem. Behav. 1994. Vol. 49. P. 33-40.

Matarredona E.R., Murillo-Carretero M., Moreno-López B., Estrada C. Nitric oxide synthesis inhibition increases proliferation of neural precursors isolated from the postnatal mouse subventricular zone // Brain Res. 2004. Vol. 995. P. 274-284.

Maurice T., Lockhart B., Privat A. Amnesia induced in mice by centrally administered b-amyloid peptides involves cholinergiic dysfunction // Brain Res. 1996. Vol. 706. P. 181-189.

Maurice T., Su T.P., Privat A. Sigma1 (sigma 1) receptor agonists and neurosteroids attenuate B25-35-amyloid peptide-induced amnesia in mice through a common mechanism // Neuroscience. 1998. Vol. 83. P. 413-428.

Mazur-Kolecka B., Golabek A., Nowicki K. et al. Amyloid-beta impairs development of neuronal progenitor cells by oxidative mechanisms // Neurobiol. Aging. 2006. Vol. 27. P. 1181-1192.

McDonald M.P., Overmier J.B. Present imperfect: a critical review of animal models of the mnemonic impairments in Alzheimer's disease // Neurosci. Biobehav. Rev. 1998. Vol. 22. P. 99-120.

McDonald M.P., Dahl E.E., Overmier Y.B. et al. Effects of an exogenous β-amyloid peptide on retention for apatial learning // Behav. Neural. Biol. 1994. Vol. 62. P. 60-67.

McDonald M.P., Dahl E.E., Overmier Y.B. et al. Reversal of β-amyloid-induced retention deficit after exposure to training and state cues // Neurobiol. Learn. Memory. 1996. Vol. 65. P. 35-47.

Miyamoto M., Hirai K., Takahashi H. et al. Effects of sustained release formulation of thyrotropin-releasing hormone on learning impairments caused by scopolamine and AF64A in rodents // Eur. J. Pharmacol. 1993. Vol. 238. P. 181-189.

Montiel T., Quiroz-Baez R., Massieu L., Arias C. Role of oxidative stress on beta-amyloid neurotoxicity elicited during impairment of energy metabolism in the hippocampus: protection by antioxidants // Exp. Neurol. 2006. Vol. 200. P. 496-508.

Moreno-López B., Noval J.A., González-Bonet L., Estrada C. Morphological bases for a role of nitric oxide in adult neurogenesis // Brain Res. 2000. Vol. 869. P. 244-250.

Mosch B., Morawski M., Mittag A., Lenz D., Tarnok A., Arendt T. Aneuploidy and DNA replication in the normal human brain and Alzheimer's disease // J. Neurosci. 2007. Vol. 27. P. 6859-67.

Murillo-Carretero M., Ruano M.J., Matarredona E.R. et al. Antiproliferative effect of nitric oxide on epidermal growth factor-responsive human neuroblastoma cells // J. Neurochem. 2002. Vol. 83. P. 119-131.

Nabeshima T., Nitta A. Memory impairment and neuronal dysfunction induced by β-amyloid protein in rats // Toh. J. Exp. Med. 1994. Vol. 174. P. 241-249.

Nitta A., Iton A., Hasegawa T., Nabeshima T. β-amyloid-protein-induced Alzheimer"s disease animal model // Neurosci. Lett. 1994. Vol. 28. P. 63-66.

Opello K.D., Stackman R.W., Ackerman S., Walsh T.J. AF64A (ethylcholine mustard aziridinium) impairs acquisition and performance of a spatial, but not a cued water maze task // Physiol. Behav. 1993. Vol. 54. P. 1227-1233.

Peng S., Garzon D.J., Marchese M. et al. Decreased brain-derived neurotrophic factor depends on amyloid aggregation state in transgenic mouse models of Alzheimer's disease // J. Neurosci. 2009. Vol. 29. P. 9321-9329.

Peunova N., Scheinker V., Cline H., Enikolopov G. Nitric oxide is an essential regulator of cell proliferation in Xenopus brain // J. Neurosci. 2001. Vol. 21. P. 8809-8818.

Pike C.J., Walencewicz-Wasserman A. J., Kosmoski J. et al. Structure-activity analyses of beta-amyloid peptides: contributions of the beta 25-35 region to aggregation and neurotoxicity // J. Neurochem. 1995. Vol. 64. P. 253-262.

Qiu W.Q., Ye Z., Kholodenko D. et al. Degradation of amyloid beta-protein by a metalloprotease secreted by microglia and other neural and non-neural cells // J. Biol. Chem. 1997. Vol. 272. P. 6641-6646.

Radak Z., Kumagai S., Taylor A.W. et al. Effects of exercise on brain function: role of free radicals // Appl. Physiol. Nutr. Metab. 2007. Vol. 32. P. 942-946.

Radak Z., Hart N., Sarga L. et al. Exercise plays a preventive role against Alzheimer's disease // J. Alzheimers Dis. 2010. Vol. 20. P. 777-783.

Reynolds B.A., Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the mammalian central nervous system // Science. 1992. Vol. 255. P. 1707-1710.

Rinner W.A., Pifl C., Lassmann H., Hortnagl H. Induction of apoptosis in vitro and in vivo by the cholinergic neurotoxin ethylcholine aziridinium // Neuroscience. 1997. Vol. 79. P. 535-542.

Rivas-Arancibia S., Guevara-Guzmán R., López-Vidal Y. et al. Oxidative stress caused by ozone exposure induces loss of brain repair in the hippocampus of adult rats // Toxicol. Sci. 2010. Vol. 113. P. 187-197.

Rogers J., Lue L. F. Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid β-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease // Neurochem. Int. 2001. Vol. 39. P. 333-340.

Rossner S., Härtig W., Schliebs R., Brückner G., Brauer K., Perez-Polo J.R., Wiley R.G., Bigl V. 192IgG-saporin immunotoxin-induced loss of cholinergic cells differentially activates microglia in rat basal forebrain nuclei // J. Neurosci Res. 1995. Vol. 41. № 3. P. 335-46.

Rush D.R., Aschmies S., Merriman M.C. Intracerebral β-amyloid (25-35) produces tissue damage: is it neurotoxic? // Neurobiol. Aging. 1992. Vol. 13. P. 591-594.

Santacana M., Uttenthal L.O., Bentura M.L. et al. Expression of neuronal nitric oxide synthase during embryonic development of the rat cerebral cortex // Brain Res. Dev. Brain. Res. 1998. V. 111. P. 205-222.

Seeger G., Härtig W., Rossner S. et al. Electron microscopic evidence for microglial phagocytic activity and cholinergic cell death after administration of the immunotoxin 192IgG-saporin in rat // J. Neurosci Res. 1997. Vol. 48. № 5. P. 465-76.

Shan X., Chang Y., Lin C.L. Messenger RNA oxidation is an early event preceding cell death and causes reduced protein expression // FASEB J. 2007. Vol. 21. P. 2753-2764.

Sigurdsson E.M., Hejna M.J., Lee J.M., Lorens S.A. beta-Amyloid 25-35 and/or quinolinic acid injections into the basal forebrain of young male Fischer- 344 rats: behavioral, neurochemical and histological effects // Behav. Brain Res. 1995. Vol. 72. P. 141-156.

Sigurdsson E.M., Lorens S.A., Hejna M.J. et al. Local and distant histopathological effects of unilateral amyloid-beta 25-35 injections into the amygdala of young F344 rats // Neurobiol. Aging. 1996. Vol. 17. P. 893-901.

Sigurdsson E.M., Lee J.M., Dong X.W. et al. Bilateral injections of amyloid-beta 25-35 into the amygdala of young Fischer rats: behavioral, neurochemical, and time dependent histopathological effects // Neurobiol. Aging. 1997a. Vol. 18. P. 591-608.

Sigurdsson E.M., Lee J.M., Dong X.W. et al. Laterality in the histological effects of injections of amyloid-beta 25-35 into the amygdala of young Fischer rats // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1997b. Vol. 56. P. 714-725.

Simon H.U., Haj-Yehia A., Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction // Apoptosis. 2000. Vol. 5. P. 415-418.

Sotthibundhu A., Li Q.X., Thangnipon W., Coulson E.J. Abeta(1-42) stimulates adult SVZ neurogenesis through the p75 neurotrophin receptor // Neurobiol. Aging. 2009. Vol. 30. P. 1975-1985.

Stranahan A.M., Mattson M.P. Recruiting adaptive cellular stress responses for successful brain ageing // Nat. Rev. Neurosci. 2012. Vol. 13. P. 209-216.

Stein-Behrens B., Adams K., Yeh M., Sapolsky R. Failure of beta-amyloid protein fragment 25-35 to cause hippocampal damage in the rat // Neurobiol. Aging. 1992. Vol. 13. P. 577-579.

Stepanichev M.Yu., Moiseeva Yu.V., Lazareva N.A. et al. Single intracerebroventricular administration of amyloid-beta (25-35) peptide induces impairment in short-term rather than long-term memory in rats // Brain Res. Bull. 2003a. Vol. 61. P. 197-205.

Stepanichev M.Yu., Zdobnova I.M., Yakovlev A.A. et al. Effects of tumor necrosis factor-alpha central administration on hippocampal damage in rat induced by amyloid beta-peptide (25-35) // J. Neurosci. Res. 2003b. Vol. 71. P. 110-120.

Stepanichev M.Yu., Zdobnova I.M., Zarubenko I.I. et al. Amyloid-beta(25-35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus // Physiol. Behav. 2004. Vol. 80. P. 647-655.

Stepanichev M., Zdobnova I., Zarubenko I. et al. Differential effects of tumor necrosis factor-alpha co-administered with amyloid beta-peptide (25-35) on memory function and hippocampal damage in rat // Behav. Brain Res. 2006. Vol. 175. P. 352-361.

Stepanichev M.Yu., Onufriev M.V., Yakovlev A.A. et al. Amyloid-beta (25-35) increases activity of neuronal NO-synthase in rat brain // Neurochem. Int. 2008. Vol. 52. P. 1114-1124.

Stepanichev M., Lazareva N., Tukhbatova G., Salozhin S., Gulyaeva N. Transient disturbances in contextual fear memory induced by Aβ(25-35) in rats are accompanied by cholinergic dysfunction // Behav Brain Res. 2014. Vol. 259. P. 152-157.

Streit W.J., Mrak R.E. Griffin W.S.T. Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective // J. Neuroinflammation. 2004. Vol. 1. P. 14.

Sweeney W., Luedtke J., McDonald M. P., Overmier J.B. Intrahippocampal β-amyloid impairs win-shift radial mase performance in rats // Neurobiol. Learn. Memory. 1997. Vol. 68. P. 97-101.

Tang Y., Yamada K., Kanou Y. et al. Spatiotemporal expression of BDNF in the hippocampus induced by the continuous intracerebroventricular infusion of beta-amyloid in rats // Brain Res. Mol. Brain Res. 2000. Vol. 80. P. 188-197.

Terranova J.P., Kan J.P., Storme J.J. et al. Administration of amyloid beta-peptides in the rat medial septum causes memory deficits: reversal by SR 57746A, a non-peptide neurotrophic compound // Neurosci. Lett. 1996. Vol. 213. P. 79-82.

Tozuka Y., Fukuda S., Namba T. et al. GABAergic excitation promotes neuronal differentiation in adult hippocampal progenitor cells // Neuron. 2005. Vol. 47. P. 803-815.

Tsunekawa H, Noda Y, Mouri A, Yoneda F, Nabeshima T. Synergistic effects of selegiline and donepezil on cognitive impairment induced by amyloid beta (25-35) // Behav. Brain Res. 2008. Vol. 190. P. 224-232.

Urani A, Romieu P, Roman FJ, Yamada K, Noda Y, Kamei H et al. Enhanced antidepressant efficacy of sigma1 receptor agonists in rats after chronic intracerebroventricular infusion of beta-amyloid-(1-40) protein // Eur J Pharmacol. 2004. Vol. 486. P. 151-161.

Van Praag H., Christie B.R., Sejnowski T.J., Gage F.H. Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999a. Vol. 96. P. 13427-13431.

Van Praag H., Kempermann G., Gage F.H. Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus // Nat. Neurosci. 1999b. Vol. 2. P. 266-270.

Varvel N.H., Bhaskar K., Patil A.R., Pimplikar S.W., Herrup K., Lamb B.T. Abeta oligomers induce neuronal cell cycle events in Alzheimer's disease // J. Neurosci. 2008. Vol. 28. P. 10786-10793.

Virok D.P., Simon D., Bozsó Z., Rajkó R., Datki Z., Bálint É., Szegedi V., Janáky T., Penke B., Fülöp L. Protein array based interactome analysis of amyloid-β indicates an inhibition of protein translation // J. Proteome Res. 2011. Vol. 10. P. 1538-1547.

Von Linstow Roloff E., Platt B., Riedel G. No spatial working memory deficit in beta-amyloid-exposed rats. A longitudinal study // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 2002. Vol. 26. P. 955-970.

Waite J.J., Wardlow M.L., Chen A.C., Lappi D.A., Wiiley R.G., Thal L.J. Time course of cholinergic and monoaminergic changes in rat brain after immunolesioning with 192IgG-saporin // Neurosci. Lett. 1994. Vol. 169. P. 154-158.

Waite, J.J., Chen, A.D., Wardlow, M.L., Wiley, R.G., Lappi, D.A., Thal, L.J. 192 Immunoglobulin G-saporin produces graded behavioural and biochemical changes accompanying the loss of cholinergic neurons of the basal forebrain and cerebellar Purkinje cells // Neuroscience. 1995. Vol. 65. P. 463-476.

Walsh T.J., Tilson H.A., DeHaven D.L. et al. AF64A, a cholinergic neurotoxin, selectively depletes acetylcholine in hippocsmpus and cortex, and produces long-term passive avoidance and radial-arm maze deficits in the rat // Brain Res. 1984. Vol. 321. P. 91-102.

Walsh T.J., Opello K.D. The use of AF64A to model Alzheimer's disease // Animal Models of Toxin-lnduced Neurological Disorders. Eds. M. Woodruff, A. Nonneman. NY: Plenum Press, 1994, P. 259-279.

Walsh T.J. Models of cholinergic degeneration: AF64A and 192-IgG-saporin // Progress in Alzheimer's and Parkinson's diseases. Eds. A. Fisher et al. NY, London: Plenum press, 1997. P. 667-674.

Wang D., Noda Y., Zhou Y., Mouri A., Mizoguchi H., Nitta A. et al. The allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors by galantamine ameliorates the cognitive dysfunction in beta amyloid25-35 i.c.v.-injected mice: involvement of dopaminergic systems // Neuropsychopharmacology. 2007. Vol. 32. P. 1261-1271.

Weldon D.T., Rogers S.D., Ghilardi J.R. et al. Fibrillar beta-amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS in vivo // J. Neurosci. 1998. Vol. 18. P. 2161-2173.

Wiley R.G., Oeltmann T.N., Lappi D.A. Immunolesioning: selective destruction of neurons using immunotoxin to rat NGF receptor // Brain Res. 1991. Vol. 562. P. 149-153.

Winkler J., Thal L.J., Gage F.H., Fisher L.J. Cholinergic strategies for Alzheimer's disease // J. Mol. Med. 1998. Vol. 76. P. 555-567.

Wortwein G., Stackman R.W., Walsh T.J. Vitamin E prevents the place learning deficit and the cholinergic hypofunction induced by AF64A // Exp. Neurol. 1994. Vol. 125. P. 15-21.

Yamada K., Nabeshima T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs // Pharmacol. Ther. 2000. Vol. 88. P. 93-113.

Yamaguchi Y., Kawashima S. Effects of b-amyloid-(25-35) on passive avoidance, radial-arm maze learning and choline acetyltransferase activity in the rat // Eur. J. Pharmacol. 2001. Vol. 412. P. 265-272.

Yamamoto T., Jin J., Watanabe S. Characteristics of memory dysfunction in olfactory bulbectomized rats and the effects of cholinergic drugs // Behav. Brain Res. 1997. Vol. 83. № 1-2. P. 57-62.

Yang Y., Mufson E.J., Herrup K. Neuronal cell death is preceded by cell cycle events at all stages of Alzheimer's disease // J. Neurosci. 2003. Vol. 23. P. 2557-63.

Yehuda S., Carraso R.L., Mostofsky D.I. Essential fatty acid preparation (SR-3) rehabilitates learning deficits induced by AF64A and 5:7-DHT // Neuroreport. 1995. Vol. 6. P. 511-515.

Изучение динамики нейродегенерации и компенсаторных механизмов у бульбэктомированных животных

Н.В. Бобкова, М.Б. Евгеньев

Содержание

1. Активация компенсаторных механизмов при болезни Альцгеймера
2. Роль βА в запуске компенсаторных механизмов при БА
3. Ферменты процессинга Аβ
4. Белки теплового шока и БА
5. Динамическая перестройка синаптического аппарата при развитии БА
6. Состояние основных нейротрансмиттерных систем при развитии БА
7. Иммунная система и компенсаторные реакции при БА, роль микро- и астроглии
8. Гормональные изменения при БА
9. Компенсаторная функция апоптоза при БА
10. Нейрогенез в мозге при БА
11. Компенсаторная активация резервных возможностей мозга при БА

1. Активация компенсаторных механизмов при болезни Альцгеймера

В настоящее время не вызывает сомнения, что болезнь Альцгеймера (БА) возникает задолго (20–30 лет) до момента ее клинической манифестации (Iacono et al., 2008). На рис. 1 представлена временная динамика развития патологии и ее поведенческие проявления при БА. Поэтому некоторые исследователи склонны рассматривать БА как болезнь адаптации (Clément, 2007). В течении болезни можно выделить состояние предболезни, когда отдельные симптомы слабо выражены, а их сочетание не представляет какого-либо определенного симптомо-комплекса.

Естественно предположить, что в организме имеются системы, активация которых способна затормозить, а возможно, и полностью приостановить развитие патологического процесса. Знание этих компенсаторных механизмов открывает новые перспективы ранней диагностики и лечения через активацию этих эндогенных защитных механизмов. До настоящего времени исследованию этих механизмов при заболеваниях с длительным скрытым латентным периодом уделялось очень мало внимания. Причина, по всей видимости, заключается в невозможности их обнаружения в клинике, когда болезнь уже находится на стадии манифестации, а компенсаторные механизмы в стадии декомпенсации. Однако в последние годы в связи с интенсивным поиском ранних маркеров заболевания, а также благодаря

Сокращения: БА – болезнь Альцгеймера; БТШ – белки теплового шока; ОБЭ, БЭ – ольфакторно бульбэктомированные животные; ПОЛ – пероксидное окисление липидов; PET – позитронно-эмиссионная томография; SPECT – фотонно-эмиссионная томография.



Рис. 1. Наличие длительной бессимптомной фазы в развитии БА

развитию новых методов прижизненного исследования мозга, таких как позитронно-эмиссионная томография (PET) и одиночная фотонно-эмиссионная томография (SPECT), появляется все больше данных, освещающих различные аспекты активации компенсаторных механизмов при БА. Во многом их изучению способствуют исследования на моделях БА у животных.

Наши работы по исследованию этих механизмов были проведены на модели спорадической формы БА на ольфакторно-бульбэктомированных (ОБЭ) животных, то есть животных с удаленными обонятельными луковицами, которые, как было показано, характеризуются морфологическими, поведенческими и биохимическими маркерами, характерными и для БА, включая потерю пространственной памяти, развитие депрессивноподобного состояния, гибель нейронов в специфических структурах мозга, ответственных за память, дефицит холинергической и серотонинергической систем мозга, повышение уровня мозгового Аβ и т.д. (Бобкова и др., 2001; Александрова и др., 2004; Bobkova et al., 2005).

Для нас, прежде всего, представляло большой интерес исследовать особенности динамики развития нейродегенеративного процесса у ОБЭ животных. С этой целью проведено тестирование уровня пространственной памяти в разные сроки после операции по удалению обонятельных луковиц, а также в эти же сроки выполнен ряд биохимических, биофизических и морфологических исследований по изучению мозга этих животных, позволивших сопоставить полученные характеристики. Обучение и тестирование памяти проводили в водном лабиринте Морриса. Статистическая обработка результатов проведена с использованием факторного анализа (One Way ANOVA). На рис. 2 представлены данные Post hok анализа поведенческих экспериментов.

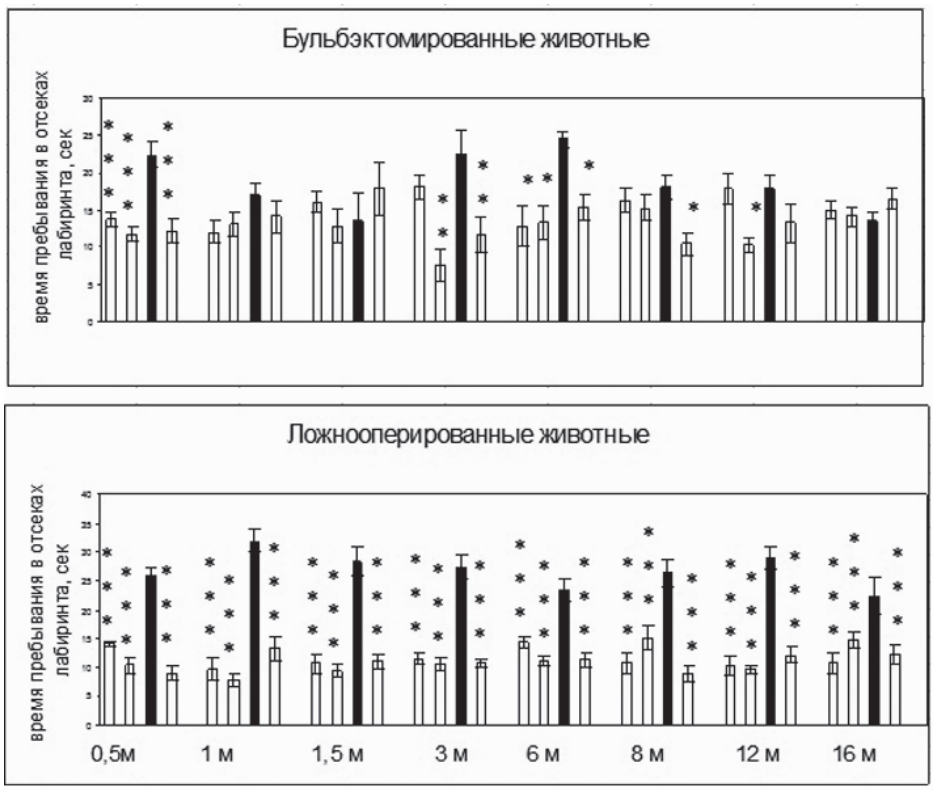


Рис. 2. Динамика изменения уровня пространственной памяти у мышей в разные сроки после удаления обонятельных луковиц

По оси абсцисс – послеоперационный период, в месяцах, когда произведено тестирование пространственной памяти. По оси абсцисс – время пребывания в отсеках лабиринта Морриса. Черным отмечены столбцы, соответствующие времени, проведенному животными в отсеке , где при обучении размещалась спасательная площадка; белые столбцы соответствуют индифферентным отсекам лабиринта. Звездочками отмечена достоверность различия показателей в индифферентных отсеках по сравнению с сектором обучения (3-ий сектор) * – $p<0,05$; **– $p<0,01$; ***– $p<0,001$

Из представленных на рис. 2 данных следует, что на протяжении 16 месяцев после бульбэктомии отмечается определенная динамика изменения уровня пространственной памяти, о которой судили по достоверности увеличения времени пребывания в отсеке обучения по сравнению с индифферентными секторами. Ложнооперированные (ЛО) животные хорошо помнили отсек обучения, о чем свидетельствует как достоверность фактора выделения отсеков, так и значения времени пребывания в нем, достоверно превышающие время, проводимое животными, в других отсеках лабиринта Морриса на всех этапах тестирования памяти. ОБЭ животные демонстрировали своеобразную динамику изменения уровня памяти: резкое снижение способности к запоминанию отсека обучения в начальный период после операции затем сменялось ее восстановлением через 6 мес. после бульбэктомии, а в период с 8 по 16 мес. (конечная точка, когда проводили тестирование памяти) память у ОБЭ-мышей вновь ухудшалась.

Важно отметить, что одновременно с изменением показателей памяти у ОБЭ животных наблюдались изменения ряда других биохимических и биофизических характеристик. Для определения уровня мозгового Аβ использовали метод ELISA. Анализ микровязкости мембран, выделенных из переднемозговых структур, проводили методом ЭПР (эмиссионно-позитронный резонанс) спиновых зондов совместно с Институтом биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН (лаб. проф. Е.Б. Бурлаковой).

Из графиков, представленных на рис. 3А,Б, следует, что ухудшение пространственной памяти через 1,5 мес. и через год после бульбэктомии происходило на фоне увеличения уровня мозгового Аβ. Особый интерес заслуживают результаты временной динамики нарушения микровязкости клеточных мембран, выделенных из грубой фракции синаптосом, и эндоплазматического ретикулюма клеток переднемозговых структур (кора, гиппокамп, подкорковые ядра переднего мозга) (рис 3В,Г).

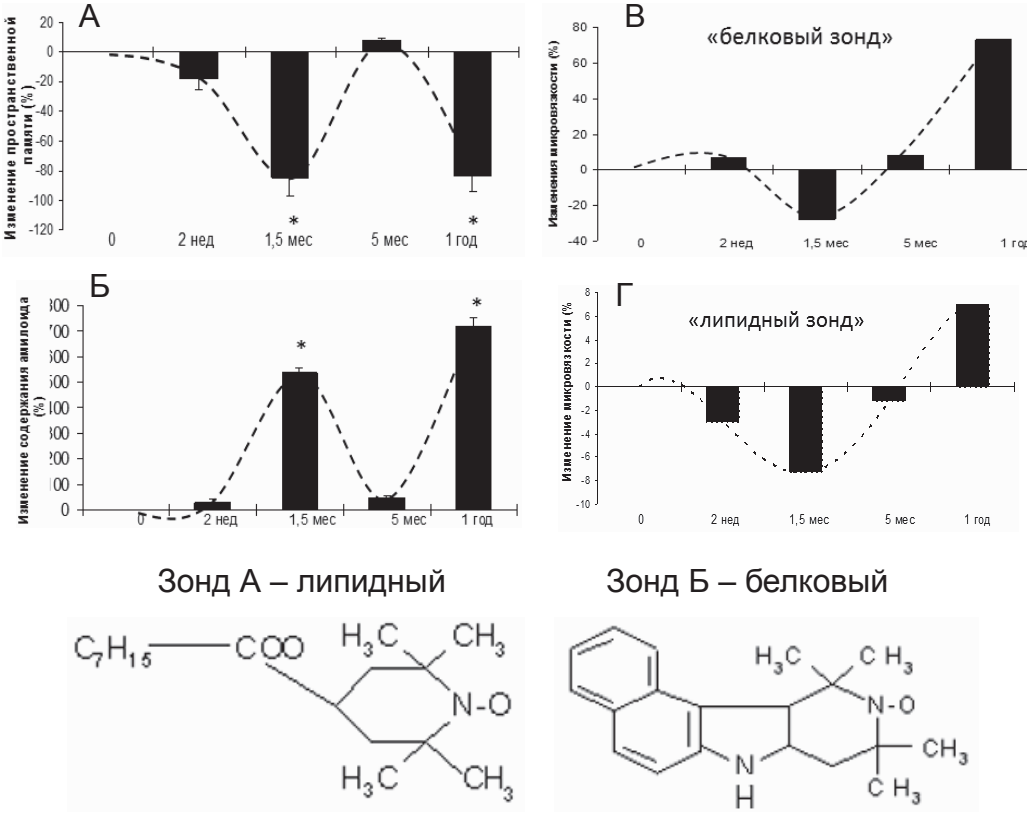


Рис. 3. Ассоциация временной динамики изменения пространственной памяти ОБЭ мышей (А), мозгового уровня Аβ (Б) и микровязкости мембран переднего мозга, оцениваемой методом ЭПР спиновых «белкового» и «липидного» зондов (В, Г)

Все данные представлены в процентах от аналогичных результатов, полученных для возрастного контроля ЛО животных

Известно, что в мембранах клеток мозга больных БА имеются нарушения системы гомеостаза пероксидного окисления липидов (ПОЛ) мембран, участвующей в регуляции клеточного метаболизма. Поэтому БА рассматривают как пример мембранной патологии, требующей систематического изучения изменений структуры и функций мембран на разных стадиях заболевания. Исследования с использованием метода ЭПР спиновых зондов позволили выявить изменения структуры (текучести) поверхностных областей липидного бислоя («липидный зонд») и прибелковых липидных доменов («белковый» зонд) мембран, изолированных из переднего мозга ОБЭ мышей в разные сроки после операции. На рис. 3В,Г приведены результаты этих исследований. Видно, что выраженность и направленность изменений текучести мембран различалась в разные сроки развития патологии. Более сильным изменениям подвержена текучесть прибелковых липидов, которые наиболее важны для функционирования ферментов, ответственных за образование Аβ. Таким образом, бульбэктомия приводит к стадийным изменениям структуры мембран мозга мышей, которые по времени совпадают с изменением уровня Аβ в мозге ОБЭ животных и уровнем их пространственной памяти.

Таким образом, получены данные, подтверждающие комплексный характер изменений биохимических и поведенческих характеристик, свидетельствующих о фазном характере течения патологического процесса у ОБЭ животных, как это наблюдается и при БА.

Уникальной особенностью нашей модели явилось воспроизведение разных стадий БА, включая и длительную латентную фазу, когда наблюдалась нормализация многих поведенческих и морфо-биохимических показателей. Исследование мозга ОБЭ животных на этой стадии развития патологии открывает новые возможности в изучении эндогенных компенсаторных механизмов. Кроме того, следует отметить, что их активация может стать одним их самых ранних диагностических признаков, свидетельствующих о начале заболевания.

В связи с этим было интересно провести анализ собственных и литературных данных с точки зрения активации компенсаторных механизмов в мозге при развитии патологии альцгеймеровского типа. Наше внимание было уделено изложению фактического материала, трактовка которого не всегда может быть однозначной.

2. Роль βА в запуске компенсаторных механизмов при БА

Основными морфологическими маркерами БА являются многочисленные амилоидные бляшки и нейрофибриллярные отложения. Согласно общепринятой гипотезе «амилоидного каскада», именно эти образования и являются ключевыми патогенными факторами возникновения БА, поскольку белок Аβ, являющийся основным компонентом амилоидных бляшек, равно как и внутриклеточный гиперфосфорилированный тау-белок, образующий нейрофибриллярные клубки, обладают нейротоксическими свойствами и запускают механизмы гибели нейронов. Поэтому новые стратегии лечения БА в основном нацелены на очистку моз-

га от амилоидных бляшек и нейрофибриллярных клубков. Однако иммунизация больных БА против Аβ оказалась малоэффективной, хотя мозг и освобождался от амилоидных агрегатов. Деменция продолжала нарастать с той же скоростью, что и в контрольной группе (Holmes et al., 2008). Чтобы понять причину этих неудач, необходимо более детально знать, какую функцию несут эти патогенные агенты в начальной стадии заболевания. В последнее время появились данные, что нейрофибриллярные клубки и βА проявляют активность антиоксидантов, а βА способен еще и образовывать хелатные комплексы с ионами таких металлов, как Cu, Fe и Zn, что может лежать в основе его нейротрофического действия (Apelt et al., 2004; Atwood et al., 2003; Lee et al., 2005). С этой точки зрения можно полагать, что начальное выделение βА и фосфорилирование тау-белка в мозге инициируется окислительным стрессом, развивающимся с возрастом, и является по своей сути ответной компенсаторной реакцией. Установлено, что на начальных этапах БА в нейронах определяются маркеры развития окислительного стресса, однако по мере прогрессирования заболевания уровень этих маркеров снижается, что позволяет рассматривать окислительный стресс также начальным компенсаторным клеточным ответом на стресс разного генеза (Moreira et al., 2006). О защитной природе начального выделения Аβ в экстраклеточное пространство свидетельствуют и данные о том, что усиление нейрональной активности в ответ на стресс сопровождается повышением содержания внеклеточного Аβ (Cirrito et al., 2005). Показано, что в острый период его уровень положительно коррелирует со степенью улучшения состояния пациентов с различными травмами мозга. Со временем при БА происходит ослабление антиоксидантных свойств Аβ и превращение его в прооксидант (Moreira et al., 2008).

В настоящее время уже не вызывает удивления представление о компенсаторной функции и самого процесса бляшкообразования, поскольку олигомеры и протофибриллы βА оказались более нейротоксичными по сравнению с нерастворимым βА, упаковынным в бляшки (Watson et al., 2005). В литературе описаны случаи бессимптомного протекания БА, когда наличие сенильных бляшек и нейрофибриллярных клубков в мозге не сопровождалось когнитивными нарушениями, но была отмечена гипертрофия клеточных тел, ядер и ядрышек нейронов гиппокампа и цингулярной коры, что авторы рассматривают как комплексное проявление компенсаторной реакции, препятствующей развитию деменции (Riudavets et al., 2007; Iacono et al., 2008).

Выражением крайней точки зрения является представление о том, что все видимые морфологические и функциональные изменения в мозге больных БА являются отражением приспособительных реакций в ответ на какое-то патогенное начало, возможно, окислительный стресс, развивающийся в мозге в процессе старения, а также при любых видах травм и воспалительных реакциях разного генеза (Castellani et al., 2008). Генерация Аβ и фосфорилирование тау-белка является попыткой восстановить окислительный гомеостаз в клетке в условиях окислительного стресса. При прогрессировании БА происходит разбаланс процессов накопления этих компонентов в нейронах и их утилизации (Moreira et al., 2008).

3. Ферменты процессинга Аβ

Как известно, для увеличения содержания Аβ необходимыми условиями являются либо увеличенный синтез белка-предшественника APP, или снижение активностей Аβ деградирующего белка неприлизина и α-секретазы, либо активация β- и γ-секретаз – ферментов, ответственных за процессинг Аβ из APP. Поэтому еще недавно их ингибиторы рассматривались как перспективные терапевтические средства для лечения БА. Однако необходимо учитывать, что такое воздействие может повлиять на процессы пролиферации, миграции и созревания нервных клеток, поскольку продукты ферментативной деградации APP, такие как sAPPα и sAPPβ, играют важную роль в этих компенсаторных процессах. Здесь же уместно отметить, что помимо APP одним из субстратов γ-секретазы является Notch-рецептор. Его внутриклеточный фрагмент, образующийся в результате деятельности γ-секретазы, проникает в ядро и инициирует синтез соединений, ответственных за направленность нейрональной дифференцировки в развивающемся мозге и за образование новых синаптических контактов у взрослых организмов. Таким образом, активация β- и γ-секретаз не только способствует повышению уровня Аβ, вызывающего апоптоз, но одновременно и стимулирует появление соединений, ответственных за активацию регенеративных процессов в мозге. Интересно отметить, что такой сильный стресс, как острая ишемия мозга, сопровождается снижением активности неприлизина и α-секретазы на фоне увеличения синтеза APP (Nalivaeva et al., 2004), что приводит к увеличению уровня Аβ. Подобные изменения сопровождаются нарушением долговременной и кратковременной памяти (Дубровская и др., 2005; Zhuravin et al., 2011). На основании этих данных можно предположить, что в условиях острого стресса (травма, ишемия, воспаление, вызванное инфекционным агентом) мозг переходит из режима нормального функционирования в режим выживания, который связан с инициацией гибели пораженных клеток, нейропротекцией клеток с небольшим нарушением и стимуляцией процессов установления новых межклеточных контактов и нейрогенеза. Аβ является одним из ключевых соединений, участвующих в запуске этих процессов. Исследования свидетельствуют, что нервные клетки способны выживать и в условиях повышенных концентраций Аβ за счет активации синтеза белков, обладающих нейропротективной активностью, таких как Thimet олигопептидаза (Pollio et al., 2008), транстиретин (Саранцева, Шварцман, 2010) и, конечно, семейство белков теплового шока.

4. Белки теплового шока и БА

В последние годы ведутся интенсивные поиски соединений, способных предотвратить или замедлить образование сенильных бляшек. В связи с этим большой интерес у исследователей вызывают белки теплового шока (БТШ), поскольку за счет шаперонных свойств БТШ препятствуют образованию Аβ агрегатов *in vitro* (Kudva et al., 1997), а через активацию микроглии (Kakimura et al., 2002) эти белки способствуют фагоцитозу Аβ. Способность БТШ70 образовывать стойкий комп-

лекс с тау-белком защищает последний от гиперфосфорилирования, а снижение содержания БТШ70 приводит к формированию нейрофибриллярных клубков в нейронах (Dou et al., 2003). Они также помогают транспортировать разрушенные протеины к местам их утилизации. В ЦНС эти белки выполняют роль нейропротекторов через активацию различных механизмов. БТШ70 может ингибировать апоптоз за счет блокирования высвобождения цитохрома из митохондрий (Klein, Brune, 2002). БТШ могут ограничивать продукцию NO и соответственно уменьшать воспалительные реакции при БА (Calabrese et al., 2000). Было также отмечено, что клетки с повышенным содержанием БТШ70 более устойчивы к глутаматной эксайтотоксичности (Yee et al., 1993), которая является одним из факторов индукции нейрональной гибели при БА. По-видимому, БТШ и особенно БТШ70 представляют собой важную эндогенную систему защиты нейронов при БА, поскольку показано увеличение их уровня в мозге больных БА (Yoo et al., 1999). Однако в пожилом возрасте начинает меняться шаперонная активность БТШ, происходят изменения в структуре и механизме их синтеза (Castegna et al., 2002). Наши исследования были проведены на модели спорадической формы БА на ОБЭ животных в разные сроки после операции. На рис. 4В приведен уровень эндогенного БТШ70 в мозге в разные сроки после бульбэктомии.

Было установлено, что наибольший подъем содержания БТШ70 наблюдался в гиппокампе через 6 месяцев после операции бульбэктомии. По времени это совпало с восстановлением памяти (рис. 4А) и снижением уровня мозгового Аβ у ОБЭ животных (см. рис. 3). С возрастом эти показатели опять ухудшались (Bobkova et

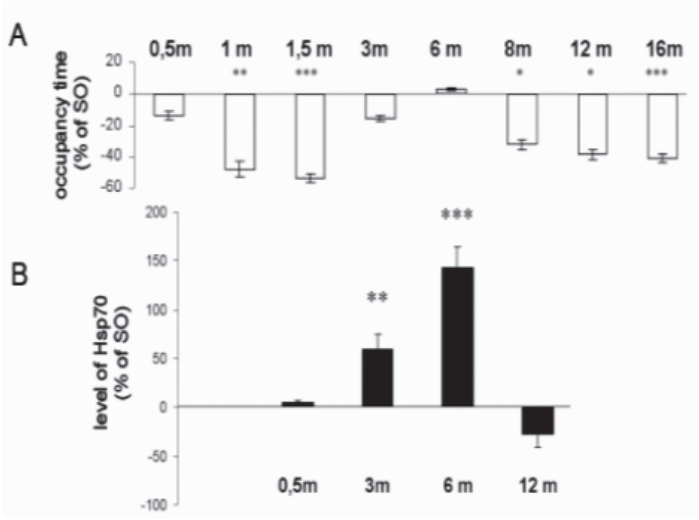


Рис. 4. Временная динамика изменения пространственной памяти (А) и уровня индуцибельной формы эндогенного белка БТШ70 в гиппокампе у ОБЭ мышей (В)

По оси абсцисс на графиках А и В – время в мес. после удаления обонятельных луковиц. По оси ординат на графике А – время пребывания ОБЭ животных в секторе водного лабиринта Морриса, где располагалась спасательная платформа во время обучения, выраженное в процентах относительно этого показателя, принятого за 100% у контрольной группы ЛО мышей, который на графике соответствует нулевой линии. На графике В – уровень БТШ70 в мозге ОБЭ мышей, выраженный в процентах относительно его содержания в мозге ЛО животных, принятого за 100%

al., 2013). Данные дают возможность предположить, что БТШ70 может играть определенную роль в наблюдаемом улучшении состояния и памяти ОБЭ-животных. Для проверки этой идеи был изучен эффект экзогенного введения БТШ70 на обучение и память ОБЭ мышей. Результаты этого исследования представлены на рис. 5.

Возможность проникновения БТШ70 внутрь клетки через активацию эндоцитоза была показана на клеточной культуре (Guzhova et al., 1998) и целостном организме (Bobkova et al., 2014). К тому же, в настоящее время уже известен ряд данных о биологических эффектах экзогенного введения БТШ70 на клеточном и организменном уровнях (Ekimova et al., 2010). Он усиливает толерантность NMDA-рецепторов к воздействию токсических агентов (Mokrushin et al, 2004), а при интраназальном введении вызывает изменение поведения животных в тесте «открытое поле» (Andreeva et al., 2004). Нами впервые было показано, что субхроническое ин-

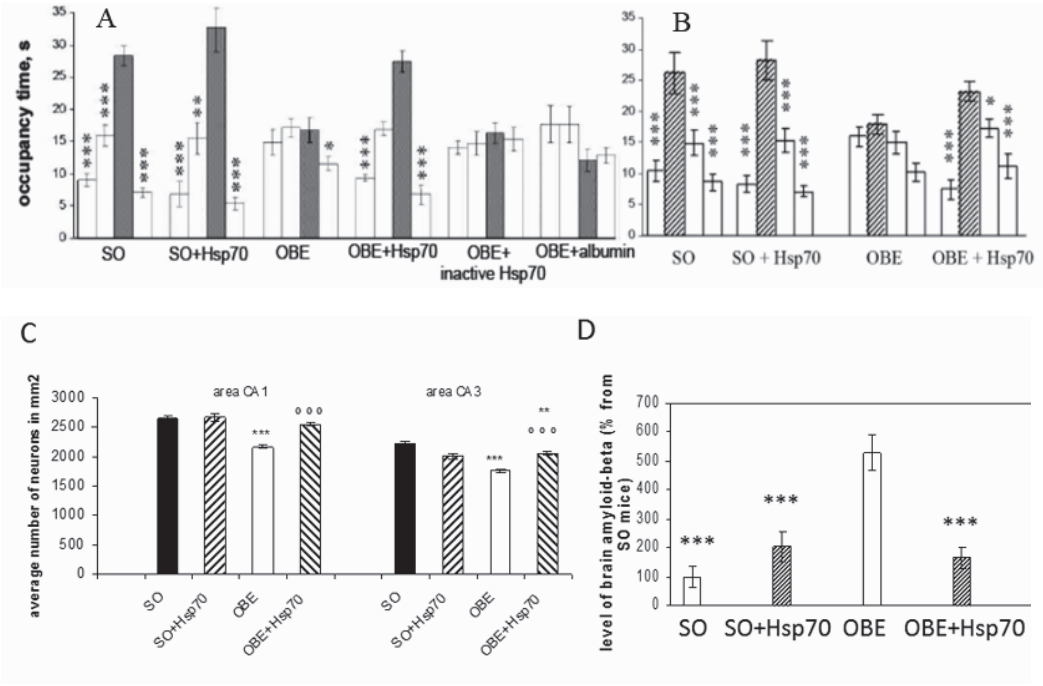


Рис. 5. Позитивный эффект интраназального введения рекомбинантного белка БТШ70 на пространственную память (A,B), нейрональную плотность в гиппокампе (C) и уровень мозгового Aβ (D)

На графиках A – результаты тестирования пространственной памяти у ОБЭ мышей сразу после 3-недельного интраназального введения БТШ70 (2мкг/мышь/день); B – через 6 мес. после отмены БТШ70. На графиках A и B по оси ординат отложено время пребывания животных в отсеках лабиринта Морриса во время тестирования пространственной памяти. Заштрихованные столбцы представляют данные для отсека обучения, белые – для индифферентных отсеков. На диаграмме C по оси ординат отложена нейрональная плотность, выраженная в количестве нейронов, определяемых на кв. миллиметр. На диаграмме D по оси ординат отложен уровень Aβ , определенный методом ELISA, в гомогенатах коры и гиппокампа, выраженный в процентах относительно его уровня у SO мышей, принятого за 100%. На всех графиках на оси абсцисс представлены группы экспериментальных животных: ЛО(SO) и ОБЭ(OBE) мышей с интраназальным введением БТШ70 (Hsp70), его инактивированной нагреванием формы или альбумина

траназальное введение БТШ70 в дозе 2 мкг/мышь/день эффективно предотвращало развитие потери пространственной памяти у ОБЭ мышей (Bobkova et al., 2014). Наши результаты подтверждаются и данными, полученными на культуре корковых нейронов с аденовиральной системой для регулируемой экспрессии индуцибельного Аβ42 и аденовиральным вектором экспрессии БТШ70. Синтез БТШ70 защищал клетку от гибели, вызываемой внутриклеточной аккумуляцией Аβ42 (Magrane et al., 2004).

5. Динамическая перестройка синаптического аппарата при развитии БА

Приспособительные изменения при БА наблюдаются и на уровне синаптической передачи. Резкое уменьшение дендритных спинов в гиппокампе у трансгенных мышей Tg2576, характеризующихся усиленной экспрессией шведской мутации APP человека, компенсируется увеличением синаптических контактов в стриатуме (Middei et al., 2008). Снижение основного белка синаптических везикул синаптофизина, что наблюдается у больных БА, у трансгенных животных и на нашей модели у ОБЭ мышей отражает уменьшение синаптической плотности вследствие дегенерации аксонов и дендритов (Scheff, Price, 2006). Эти изменения в пресинаптическом аппарате частично компенсируются увеличением плотности постсинаптического белка PSD-95, который, в частности, ответственен за нормальное функционирование AMPA и NMDA рецепторов, поскольку выполняет важную функцию связывания рецепторного белка с цитоскелетом (Leuba et al., 2008). Важно отметить, что именно эти рецепторные образования важны для процессов обучения и памяти.

6. Состояние основных нейротрансмиттерных систем при развитии БА

Для БА характерным является дефицит основных нейротрансмиттерных систем мозга, с которым связывают когнитивные нарушения, развитие депрессивного состояния или агрессивности (Garcia-Alloza et al., 2006). Однако в процессе развития патологии отмечается ряд перестроек в их деятельности, которые можно рассматривать как компенсаторные реакции, направленные на поддержание ослабленной функции нейромедиаторных систем. При БА уменьшение никотиновых рецепторов α7-типа на нейронах коры компенсируется увеличением этого типа рецепторов на проекционных нейронах базального ядра Мейнерта и астроглии в неокортексе (Xiao et al., 2006; Counts et al., 2007), а также некоторым увеличением плотности мускариновых (М1) рецепторов. Однако одна из современных гипотез предполагает, что βА (1-42) за счет высокоаффинного связывания с α7-субъединицей ацетилхолинового рецептора через активацию механизма эндоцитоза проникает внутрь клетки, после чего через вторичные мессенджеры g-белкового семейства запускает каскад реакций, приводящих к апоптозу и лизису клетки (D'Andrea, Nagele, 2006).

С этой точки зрения снижение плотности этого типа рецепторов является приспособительной реакцией, повышающей выживаемость нейронов коры, но приводящей к ухудшению памяти. Галаниновая гипериннервация нейронов базального ядра активирует экспрессию мРНК холинацетилтрансферазы – фермента, ответственного за синтез ацетилхолина (Counts et al., 2008). На этапе поведенческой компенсации у ОБЭ животных нами было обнаружено восстановление плотности нейронов, содержащих холинацетилтрансферазу в крупноклеточном преоптическом ядре гипоталамуса – аналоге ядра Мейнерта у человека.

Интересные перестройки претерпевает и глутаматергическая система в процессе развития БА. Как правило, отмечается редукция числа NMDA-рецепторов, проходящая на фоне возрастания плотности каинатных рецепторов. Варьирование в плотности рецепторов не сопровождается изменением их аффинности (Nordberg, 1992).

С использованием метода позитронно-эмиссионной томографии у пациентов с мягким когнитивным нарушением, которые с некоторым приближением могут рассматриваться как случаи раннего проявления БА, обнаружено значительное увеличение плотности серотониновых 5-НТ1-рецепторов на гиппокампальных нейронах по сравнению со здоровыми людьми того же возраста. У больных с диагностированной БА уже происходит уменьшение плотности этого типа рецепторов (Truchot et al., 2007). В наших исследованиях на модели спорадической формы БА на ОБЭ животных также наблюдалось компенсаторное увеличение плотности 5-НТ1-рецепторов в новой коре и гиппокампе на фоне дефицита содержания серотонина в стволе мозга, где расположено основное серотонинсинтезирующее ядро шва (n.raphe) (Gurevich et al., 1993). Установленным фактом при БА является снижение числа нейронов в ядре Locus coeruleus, где находятся нейроны, синтезирующие норадреналин и посылающие свои аксоны в гиппокамп и кору. Компенсаторным ответом, направленным на поддержание норадренергической иннервации при БА, является спрутирование терминалей оставшихся в живых норадренергических нейронов, а также увеличение плотности пресинаптических α2 – адренорецепторов и постсинаптических α1 адренорецепторов в гиппокампе (Szot et al., 2007), а также гиперактивность оставшихся в живых норадренергических нейронов (Hoogendijk et al., 2001). Возможно, эти компенсаторные перестройки являются одной из причин резких перепадов настроения больных БА и развития агрессивности.

ГАМК- и дофаминергическая системы в отличии от холинергической и глутаматергической систем в меньшей степени подвержены изменениям при БА. Тем не менее, при прогрессировании БА отмечается увеличение плотности ГАМК(А) рецепторных субъединиц (Rissman et al., 2007), что компенсирует снижение уровня ГАМК во фронтальной и височной коре (Garcia-Alloza et al., 2006). Как уже указывалось выше, на начальных этапах БА наблюдается усиленная активность части нейронов, компенсирующая утраченную активность погибающих клеток. У трансгенных животных, характеризующихся усиленным синтезом гуманизированного белка APP, отмечено спрутирование ГАМК-ергических терминалей в коре и гиппокампе. Усилением возбудительных и тормозных процессов на фоне ухудшения

пластичности нейронов зубчатой фасции исследователи объясняют появление судорожной электрической активности в коре и гиппокампе трансгенных животных, проходящей без поведенческого проявления конвульсий (Palop et al., 2007).

При БА компенсаторные перестройки происходят и в деятельности пептидергической системы мозга: снижение в плотности рецепторов к соматостатину и нейропептиду Y сопровождается увеличением мест связывания с кортикотропин-релизинг-фактором (Nordberg, 1992).

7. Иммунная система и компенсаторные реакции при БА, роль микро- и астроглии

Известно, что больные БА характеризуются выраженным иммунодефицитом, который воспроизводится и на модели БА у ОБЭ животных (Новоселова и др., 2003). Однако на определенном этапе развития БА в сыворотке крови начинают определяться антитела к Аβ. Трактовка их образования неоднозначна. Первоначальное представление о патологической аутоиммунной реакции в настоящее время несколько изменилось, поскольку эти антитела появляются только на определенной фазе заболевания и никогда не наблюдаются на его терминальной стадии. Поэтому можно предположить компенсаторную функцию таких антител, поскольку через связывание с Аβ они будут способствовать снижению его концентрации в общем кровотоке и тем самым ускорять его выход из ткани мозга. Показано, что антитела к Аβ проникают в мозг и там через активацию микроглии либо через непосредственное связывание с фибриллярными и олигомерными формами Аβ активируют процесс их удаления из мозга. Однако для реализации такой компенсаторной реакции должно произойти серьезное изменение в проницаемости гемато-энцефалического барьера (ГЭБ), что и наблюдается у больных БА, поскольку сам Аβ вызывает нарушение целостности ГЭБ (Ujiie et al., 2003). Это имеет и отрицательные последствия, т.к. мозг становится более уязвимым ввиду нарушения его иммунопривилегированности.

Микроглия является иммунными клетками мозга, обеспечивающими первую линию защиты путем стимуляции выделения цитокинов при узнавании патоген-ассоциированного микробного паттерна. Цитокины в свою очередь активируют механизмы адаптивного иммунного ответа. Через фагоцитоз микроглия освобождает мозг от патогенов и зашлакованности. Отрицательным побочным эффектом активации микроглии является воспалительная реакция, которая может вызвать поражение ткани мозга, что и происходит при БА. Высказывается предположение о сниженной способности микроглии и макрофагов в мозге больных БА к фагоцитозу Аβ, что компенсаторно приводит к гиперэкспрессии провоспалительных цитокинов для активации этой функции. Однако повышенная концентрация таких цитокинов вызывает хронический воспалительный процесс в мозге (Fiala et al., 2007). Данный пример наглядно иллюстрирует возможность отрицательных последствий компенсаторной реакции.

Астроциты – одна из самых многочисленных групп глиальных клеток в ЦНС, однако их роль до сих пор остается не до конца выясненной. Эти клетки имеют достаточно крупные размеры и множество извитых отростков, переплетающихся вокруг нейронов и образующих специфические контакты-«ножки», прилегающие к капиллярам. Только в этих глиальных клетках обнаружены тонкие фибриллы, содержащие маркерный белок – глиальный кислый протеин-GFAP. В настоящее время уже не вызывает сомнения, что астроциты в мозге выполняют не только поддерживающую функцию. Они участвуют в ресинтезе глутамата и осуществляют контроль над его внеклеточной концентрацией. Известна их способность оказывать влияние на формирование синапсов на нейронах, а также контролировать их структурную и функциональную пластичность. Астроциты ответственны за поддержание ионного, нейротрансмиттерного и водного гомеостазов в экстрацеллюлярном пространстве мозга. Способность образовывать сети и отвечать на гуморальные стимулы позволяет им передавать информацию внутри синтициума на длинные дистанции, что обеспечивает формирование интегрального ответа на множество раздражителей. Показано, что они участвуют в транспорте веществ из крови к нейронам и, возможно, обратно в кровь. Осуществляя в норме функцию «домоправительницы» в мозге, астроглия меняет свою активность при ряде заболеваний. Одним из ранних нейропатологических проявлений при БА является скопление астроцитов в местах амилоидных депозитов (Ma, 2001), однако причина и значение этого явления не ясна. Недавно была обнаружена способность астроглии утилизировать Аβ (Nagele et al., 2004) и остатки дегенерирующих нейронов, а также предотвращать формирование зрелых бляшек (Wyss-Coray et al., 2003). В опытах *in vitro* астроциты, помещенные на переживающие срезы мозга трансгенных животных, очищали их от амилоидных бляшек, а фрагменты Аβ определись внутри астроцитов. Астроглия участвует в деградации Аβ путем экспрессии и секреции матриксных металлопротеиназ вблизи амилоидных бляшек. Более того, даже среда, в которой культивировались астроциты, содержит определенное количество металлопротеиназ-2 и -9, что проявляется в ее способности расщеплять Аβ на различные фрагменты (Yin et al., 2006). На рис. 6 приведены результаты наших исследований состояния астроглии в мозге ОБЭ мышей на этапе латентной фазы протекания нейродегенеративного процесса альцгеймеровского типа.

Мы обнаружили значительное увеличение числа контактов отростков астроглии с микрососудами мозга в новой коре и в гиппокампе. Иммуногистохимические исследования с антителами к концевому фрагменту Аβ выявили включение Аβ в астроциты, которые были идентифицированы с помощью антител к GFAP, что не наблюдалось на этапе манифестации развития патологии (Бобкова и др., 2005). Приведенные литературные и собственные данные свидетельствуют об утилизации Аβ астроглией. Однако в наших экспериментах нельзя исключать и возможность эндогенного синтеза этого пептида самими астроцитами. Активация фагоцитарной способности микро- и астроглии является компенсаторной реакцией на избыток генерации Аβ в мозге, которую в перспективе можно использовать для разработки нового подхода к лечению БА.

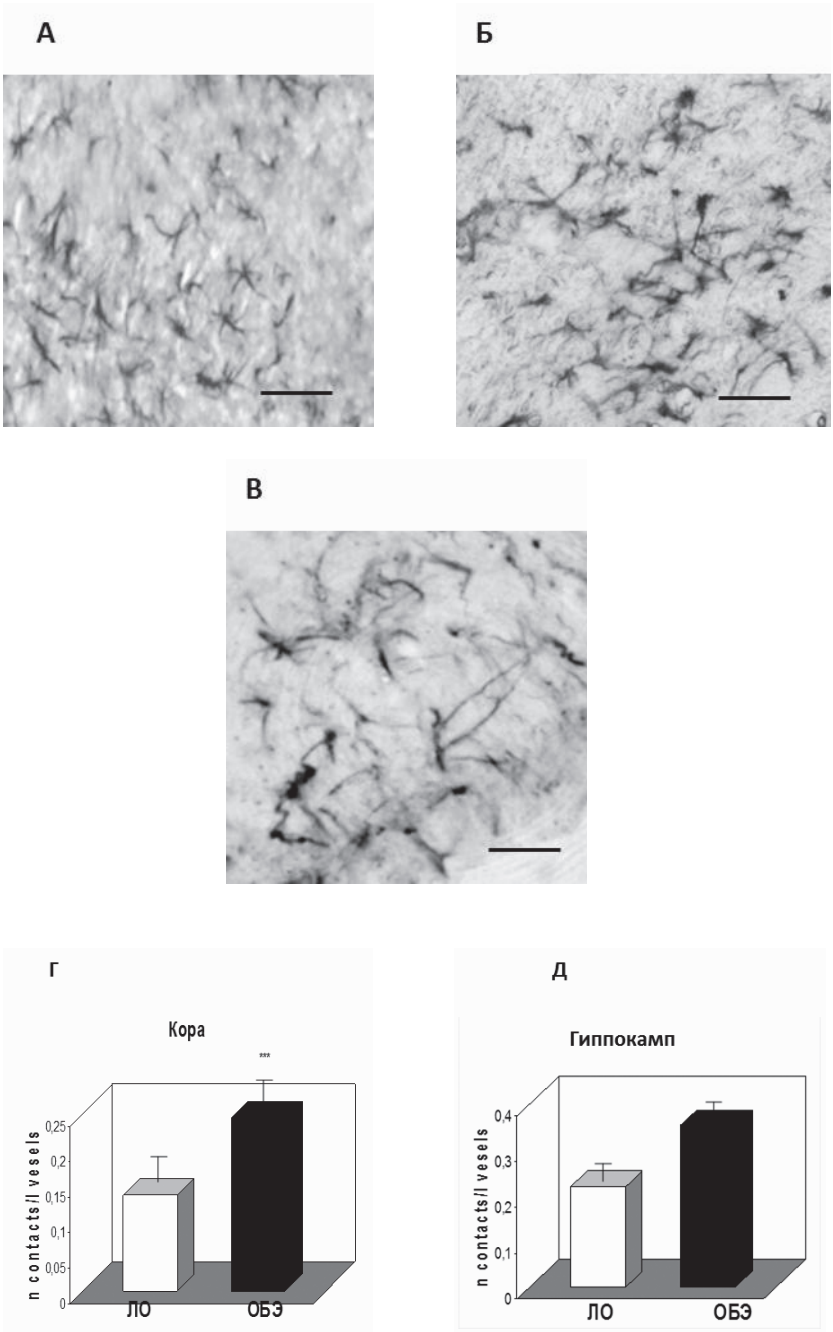


Рис. 6. Микрофотографии астроглии в срезах мозга ЛО (А) и ОБЭ (Б) мышей через 3 мес. после операции (гистоиммунохимическая окраска с применением антител к GFAP). В – гистоиммунохимическая окраски срезов мозга ОБЭ мышей с использованием антител к концевому фрагменту Aβ 1-40 (антитело R163). Г, Д – плотность контактов астроглии с микрососудами мозга (n контактов на единицу длины сосуда) в коре и гиппокампе ОБЭ мышей на этапе компенсации поведенческих нарушений. Шкала 25 мкм

8. Гормональные изменения при БА

В настоящее время активно обсуждается защитная роль женских половых гормонов, в частности, обусловленная высоким потенциалом их антиоксидантной активности. Нейропротекторная роль эстрогенов обусловлена как их прямым взаимодействием с нейронами, так и опосредованным их действием через активацию глутаматных транспортеров в астроглии, что способствует снижению эксайтотоксичности внеклеточного глутамата (Pawlak et al., 2005). Одним из механизмов нейропротективного действия половых гормонов андрогена и эстрогена является также стимуляция синтеза БТШ70 в клетке (Zhang et al., 2004). С возрастом отмечается резкое снижение уровня половых гормонов эстрогена и тестостерона, что в последующем вызывает компенсаторное увеличение гонадотропина – лютеинизирующего гормона, который, по мнению ряда авторов, и может играть ключевую роль в генезе БА (Webber et al., 2007). Поэтому столь популярна заместительная гормональная терапия. Однако в отношении ее эффективности, особенно в пожилом возрасте, имеются весьма противоречивые сведения. Серьезное исследование на эту тему, проведенное недавно в США (Women's Health Initiative Memory Study), дало отрицательные результаты по применению эстрогенотерапии у женщин в постклимактерическом возрасте (Craig et al., 2005; Almeida, Flicker, 2005). К тому же, регулярный прием эстрогена в виде эстрадиола повышает риск заболевания раком молочной железы. В этом случае компенсаторное увеличение уровня БТШ70 повышает устойчивость раковых клеток к стрессорным воздействиям, в том числе и к действию цитостатиков. Поэтому в настоящее время акцент перенесен на антигонадотропины, которые могут стать новыми терапевтическими средствами против БА (Gregory et al., 2006).

9. Компенсаторная функция апоптоза при БА

Одним из проявлений БА на уровне клетки является нарушение гомеостаза кальция. И крайним проявлением этого процесса является его накопление и запуск процесса апоптоза – запрограммированной гибели клеток. Апоптоз играет существенную роль в процессе развития мозга, инициируя гибель нейронов, не установивших контакты с другими клетками к определенному сроку эмбрионального развития. Интересно отметить, что именно в этот период наблюдается и увеличение уровня Аβ в мозге. Нарушение апоптоза является одной из причин развития опухолевого процесса. Через апоптоз поддерживается динамическое равновесие функционирующих клеток в мозге. При БА это равновесие сдвигается в сторону активации апоптоза, при раке – в сторону его торможения, что вызывает активацию пролиферативного процесса. По-видимому, ключевую роль в этом процессе играет регуляция активности белка P53. Предполагается, что активация апоптоза при БА является ответной реакцией на нарушение клеточного цикла, наблюдаемого во многих нейрональных клетках. Запрещенной попыткой для нейронов является вхождение в фазу, предшествующую делению клетки, что неминуемо заканчива-

ется активацией апоптоза и ее гибелью (Arendt et al., 1998). Интересно отметить, что в мозге больных БА отмечается много нейронов с фрагментацией ДНК, но не подвергающихся апоптозу. Одним из компенсаторных механизмов, активируемых в таких нейронах, является активация проонкогена Bcl-2, продукт которого тормозит развитие апоптоза (Cotman, 1998). Однако активация Bcl-2 наблюдается и при развитии рака молочной железы, при этом она положительно регулируется через гормональные рецепторы (Lee et al., 2007).

10. Нейрогенез в мозге при БА

Еще до недавнего времени господствовало представление о невозможности нейрогенеза в мозге взрослых млекопитающих и человека, хотя это явление было открыто более 30 лет назад. Сейчас это одна из наиболее «горячих» тем не только нейрофизиологии, но и многих смежных дисциплин. Основными структурами мозга, где происходит нейрогенез во взрослом организме, являются субвентрикулярная зона и зубчатая фасция гиппокампа, а также обонятельная луковица, которую с субвентрикулярной зоной связывает переднемозговой миграционный путь, по которому двигаются нейрональные прогениторы, постепенно дифференцируясь в нейроны, олигодендроциты и астроциты (Kato et al., 2001). Показано, что в стареющем мозге наблюдается нарушение нейрогенеза, что может быть одной из причин развития нейродегенеративных заболеваний, включая и БА (McDonald, Wojtowicz, 2005). Однако при БА обнаружено и усиление пролиферативной активности в мозге (Jin et al., 2004). В настоящее время нет полной ясности в этом вопросе ввиду весьма противоречивых данных, полученных в эксперименте на животных моделях БА и в клинике. Исследования с использованием трансгенных животных – моделях БА, не внесли ясности в решение этого вопроса, поскольку в подавляющем большинстве трансгенные животные демонстрировали снижение выраженности нейрогенеза (Dong et al., 2004). С другой стороны, модели ускоренного старения у крыс показали усиленный нейрогенез в гранулярных клетках гиппокампа, выраженность которого положительно коррелировала с когнитивным дефицитом (Bizon, Gallagher, 2005). Результаты наших исследований пролиферативной активности в мозге ОБЭ мышей представлены на рис. 7.

В наших исследованиях максимальная пролиферативная активность, которая определялась по включению в клетки мозга BrdU, отмечена в гиппокампе, субвентрикулярной зоне и височной коре ОБЭ животных через 3–4 недели после бульбэктомии, т.е. на фоне развития нейродегенеративных изменений. Действительно, именно в этот период после операции бульбэктомии наблюдали снижение нейрональной плотности у ОБЭ мышей: в височной коре – на 10±1,8%, в поле CA1 гиппокампа – на 18,3±2,6%; в поле CA3 гиппокампа – на 23,8±3,1%, в холинергических структурах переднего мозга (горизонтальном ядре вертикального пучка Брока и гигантоклеточном преоптическом ядре) – на 44,1±9,2%, в хвостатом ядре и скорлупе – на 29±3,1% (Бобкова и др., 2001). Клетки дорзального ядра шва, ответственные за синтез серотонина и обеспечивающие им переднемозговые структуры и кору, рез-

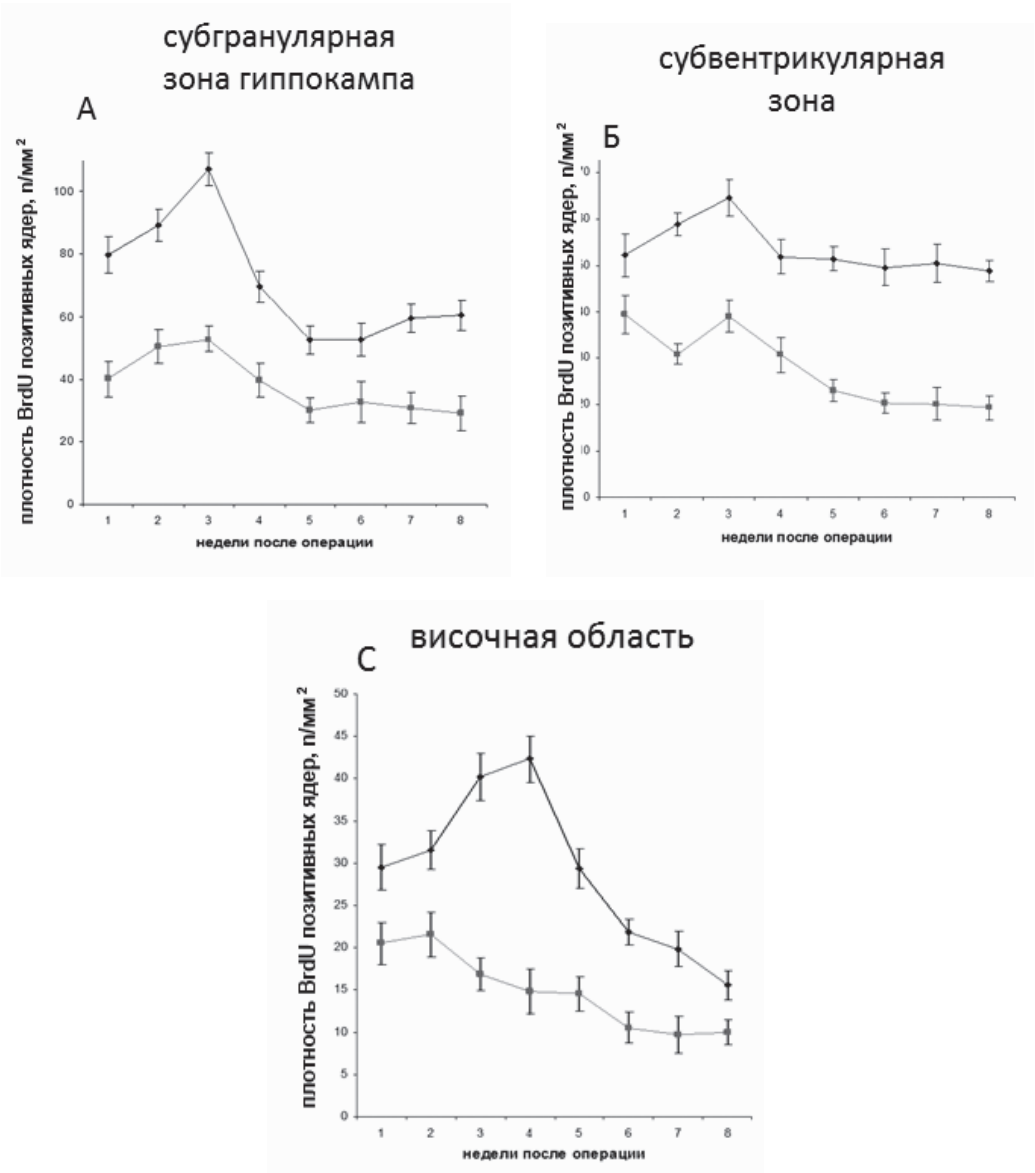


Рис. 7. Активация пролиферативной активности в суправентрикулярной зоне (А), гранулярном слое зубчатой фасции гиппокампа (Б) и височной коре (С), вызванная удалением обонятельных луковиц. По оси абсцисс отложено время после бульбэктомии в неделях, по оси ординат – плотность иммунопозитивных к BrdU ядер (n/мм^2) в соответствующих структурах мозга

ко меняли свою форму и демонстрировали различные формы патологии – пикноз, кариолизис, цитолиз. Число нормальных клеток снижалось до 50,6±10%. Этот факт дает основание думать, что инициатором активации пролиферативной активности в мозге является сама гибель клеток и выделение факторов, компенсаторно усиливающих пролиферативную активность и нейрогенез (Bobkova et al., 2006). Па-

мять у ОБЭ животных начинала восстанавливаться только через 12 недель после операции. В это время в гиппокампе и коре были обнаружены нейрональные прогениторы, одновременно иммунопозитивные как к BrdU, так и маркерам разных стадий клеточной дифференцировки, таким как виментин, 3-β-тубулин и NeuN. Наличие клеток с 3-β-тубулином и NeuN указывает на активацию нейронального ростка дифференцировки, т.е. происходит не только стимуляция образования новых глиальных элементов, но и нейронов. Период функциональной компенсации характеризовался постепенным восстановлением нейрональной плотности в ацетилхолин- и серотонинсинтезирующих ядрах, в которых через 6 мес. после удаления обонятельных луковиц уже не обнаруживалось ухудшения морфофункционального состояния нейронов. На рис. 8 представлена динамика восстановления плотности нейронов в структурах, синтезирующих серотонин, ацетилхолин и норадреналин.

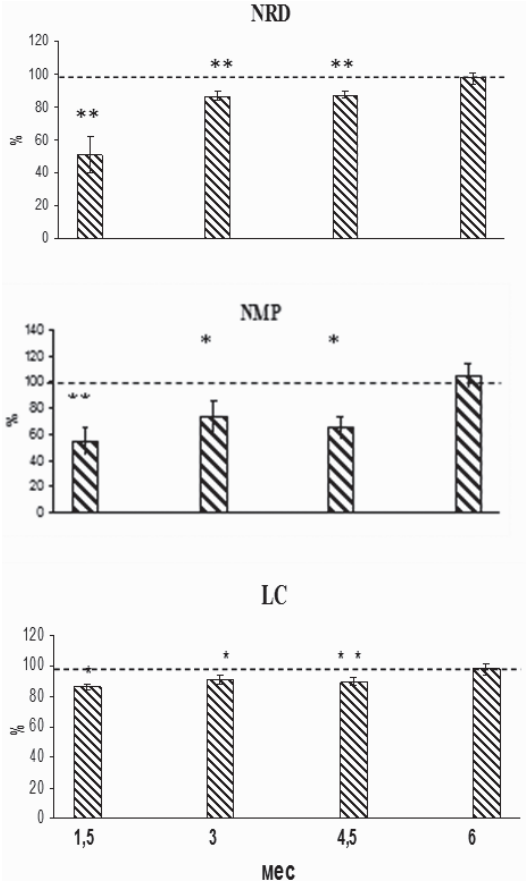


Рис. 8. Динамика восстановления нейрональной плотности в подкорковых ядрах, отвечающих за синтез основных нейромедиаторов в мозге в разные сроки после удаления обонятельных луковиц

Обозначения: NRD (дорзальное ядро шва) – ядро, синтезирующее серотонин; NMP (преоптическое крупноклеточное ядро) – ядро, синтезирующее ацетилхолин; LC (голубоватое пятно) – ядро, синтезирующее норадреналин. По оси абсцисс отложено время в месяцах, прошедшее после бульбэктомии; по оси ординат – нейрональная плотность у ОБЭ мышей, выраженная в процентах относительно аналогичного показателя у ЛО животных в те же послеоперационные сроки

В мозге ОБЭ животных в этот период нормализовался уровень серотонина и увеличивалось число нейронов, позитивных к антителам против холинацетилтрансферазы, в базальных структурах переднего мозга. Восстановление серотонинергической функции должно способствовать дальнейшему процессу нейрональной дифференцировки прогениторных клеток через активацию синтеза мозгового нейротрофического фактора BDNF (Mattson et al., 2004). Важно отметить, что обе эти системы через активацию 5-HT2a или 5-HT2c рецепторов, а также через мускариновые рецепторы, связанные с активацией фосфолипаз и киназ, способствуют активации α-секретазы, ответственной за неамилоидогенный путь метаболизма APP (Nitsch et al., 1996). Возможно, восстановление функционирования этих систем является одним из факторов, ответственных за снижение уровня Aβ, которое мы наблюдали на этапе компенсации у ОБЭ животных. Детальные исследования на трансгенных животных с усиленной продукцией APP в разные возрастные периоды показали активацию нейрогенеза у молодых животных и его снижение по мере накопления в их мозге Aβ (Jin et al., 2004a,b; López-Toledano, Shelanski, 2007; Gan et al., 2008). Однако, по данным других исследователей, Aβ из сенильных бляшек в основном стимулирует нейрогенез, но не глиогенез (Gan et al., 2008). Наши и литературные данные свидетельствуют, что активация нейрогенеза является одним из компенсаторных механизмов, используемых организмом, чтобы противодействовать развитию нейродегенеративного процесса на этапе стертой формы течения патологии. Для проверки данного предположения нами были выполнены опыты с трансплантацией фетальной ткани обонятельной луковицы, содержащей нейрональные прогениторы, в мозг ОБЭ животных через 7 мес. после бульбэктомии, т.е. в период, предшествующий манифестации патологии (рис. 9).

Эффективность трансплантации проявилась в улучшении памяти ОБЭ животных и нормализации морфо-функционального состояния нейронов височной коры и полей гиппокампа, в то время как ОБЭ животные, которым вводился физиологический раствор или ткань мозжечка, демонстрировали выраженную поведенческую и морфологическую патологию. Таким образом, эти данные свидетельствуют о компенсаторной роли активации нейрогенеза при развитии нейродегенерации и целесообразности его активации при БА.

11. Компенсаторная активация резервных возможностей мозга при БА

Известно, что нейроны чрезвычайно чувствительны к недостатку кислорода. При БА наблюдается парадоксальное явление – длительное сохранение нормальной функциональной активности в областях мозга с выраженной атрофией серого вещества, что обеспечивается компенсаторным усилением мозгового кровотока в этих районах (Alsop et al., 2008) и гиперактивностью оставшихся в живых нейронов. Здесь же уместно коснуться проблемы резервных когнитивных возможностей. Установлено, что у высокообразованных людей клинические проявления БА задерживаются, несмотря на выраженные морфологические проявления развития

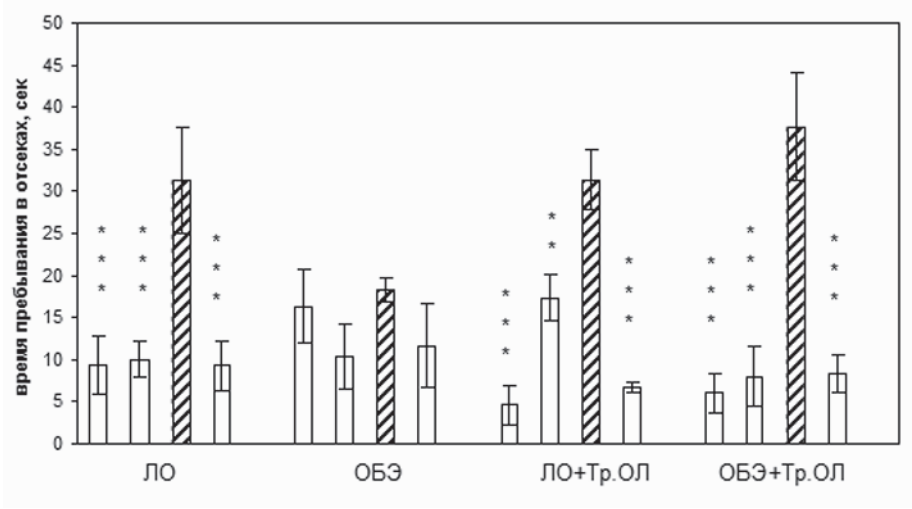


Рис. 9. Позитивный эффекттрансплантации в мозг фетальной ткани обонятельной луковицы на память ОБЭ мышей

Обозначения: ЛО+Тр.ОЛ и ОБЭ+Тр.ОЛ – группы ложнооперированных и бульбэктомированных-животных с трансплантацией в мозг фетальной ткани (15 дн. зародышей мыши) обонятельной луковицы. Остальные обозначения те же, что и на рис. 5

патологического процесса в мозге, что исследователи связывают с компенсаторным подключением других непораженных патологическим процессом структур (Kemppainen et al., 2008). Как известно, наличие аллели ApoE4 в геноме является фактором риска развития не только БА, но и сердечно-сосудистых заболеваний (Christensen et al., 2008). В отличие от ApoE2 и ApoE3 ApoE4 имеет взаимодействующие концевые N- и C-домены, образующие глобулярную структуру. При стрессе под влиянием внутриклеточных протеаз ApoE4 распадается на токсические фрагменты, которые через разрушение цитоскелета и митохондрий вызывают гибель нейронов (Mahley et al., 2006). Однако, согласно некоторым исследованиям, носители этой аллели проявляют более высокие способности к обучению в молодом возрасте, а в более пожилом возрасте для компенсирования сниженных когнитивных способностей в преклиническом периоде БА у них активировано больше мозговых структур (Han et al., 2008). В связи с этим интересно отметить и такое наблюдение – риск быстрой генерализованной атрофии всего мозга при БА имеют лица до 65 лет, не являющиеся носителями ApoE4-аллели, в то время как имеющие в геноме эту аллель характеризуются в основном атрофией гиппокампа и более медленным развитием БА (сенильной деменции) (Sluimer et al., 2008; Rogaev, 2012).

Интересные наблюдения развития компенсаторных реакций были сделаны на больных с синдромом Дауна, который обусловлен трисомией по 21 хромосоме, где локализован и ген APP. Почти у всех взрослых больных в мозге возникают нейропатологические изменения, характерные для БА. Однако деменция не развивается или ее клинические проявления задерживаются на десятилетие. Важно отметить, что у пациентов с синдромом Дауна обнаружено усиление метаболизма в структу-

рах, которые поражаются при БА, а также гиперпродукция протеинов, важных для нейронального развития и образования синапсов (Head et al., 2007)

Исследования на трансгенных животных – моделях БА, преподнесли много сюрпризов экспериментаторам. Так, оказалось, что в раннем возрасте у knock-in APP/PS1-мышей нейроны менее чувствительны к нейротоксическому действию Аβ, однако в процессе старения они утрачивают это качество и быстрее гибнут при его аппликации. Эта особенность нейронов трансгенных животных, в частности, связана с усиленной активностью митохондриальной супероксиддисмутазы у молодых трансгенных животных и ее торможением у старых (Sompol et al., 2008). В раннем возрасте такие трансгенные животные обладают лучшими способностями к обучению, которые по мере взросления резко ухудшаются. Эти данные позволяют высказать предположение о функции Аβ в здоровом организме как о регуляторе баланса соотношения молодых и старых клеток. По-видимому, не случайно он является фрагментом белка APP, связанного с регенерацией, синапто- и нейрогенезом.

Большинство нейродегенеративных заболеваний, включая и БА, возникают в пожилом возрасте, когда приспособительные возможности организма постепенно теряют свое адаптационное значение, что и способствует развитию патологии. По-видимому, при БА вырабатывается новый функциональный и морфологический стереотип, который является не просто нарушением функций, а своеобразным проявлением приспособительных компенсаторных реакций, когда нормальное функционирование структур мозга, ответственных за обучение, память и ориентацию в пространстве, а также за когнитивную деятельность, сменяется борьбой нервных клеток за свое выживание.

Длительное время развитие патологического процесса при БА сдерживается активацией множества компенсаторных механизмов, действующих на молекулярно-клеточном и организменном уровнях. Согласованность в деятельности компенсаторных механизмов является непременным условием их эффективности. По-видимому, каждой фазе развития патологии соответствует и свой набор компенсаторных механизмов, поэтому их обнаружение является надежным диагностическим маркером разных стадий БА. Декомпенсация может наступить как при гиперактивации, так и при снижении активности отдельных компенсаторных механизмов. Регуляция эндогенных компенсаторных механизмов может стать новым перспективным подходом для профилактики и лечения БА. Мы продемонстрировали это на примере с интраназальным введением БТШ70 и продолжаем активно работать над возможностями стимуляции нейрогенеза в терминальной стадии развития патологии (Бобкова и др., 2013).

Литература

Александрова И.Ю., Кувичкин В.В., Кашпаров И.А. и др. Повышенный уровень бета-амилоида у бульбэктомированных мышей // Биохимия. 2004. Т. 69. № 2. С. 218-224.

Бобкова Н.В., Нестерова И.В., Нестеров В.И. Состояние холинергических структур переднего мозга у бульбэктомированных мышей // БЭБМ. 2001. Т. 131. С. 507-511.

Бобкова Н.В, Нестерова И.В., Медвинская Н.И. и др. Роль астроглии в компенсаторных механизмах мозга // Сборник статей по материалам Первого Международного Междисциплинарного Конгресса «Достижения нейронауки для современной медицины и психологии». Судак, Крым, Украина, 2005. С. 40-42.

Бобкова Н.В., Полтавцева Р.А., Самохин А.Н. и др. Терапевтический эффект мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток на память животных с нейродегенерацией альцгеймеровского типа // Клеточные технологии в биологии и медицине 2013. Т. 3. С. 123-127.

Дубровская Н.М., Наливаева Н.Н., Тернер Э.Д. и др. Влияние ингибиторов α-секретазы, метаболизирующей предшественник амилоидного пептида на формирование памяти у крыс // ЖВНД. 2005. Т. 55. № 6. С. 725-728.

Новоселова Е.Г., Бобкова Н.В., Синотова О.А. и др. Иммунный статус бульбэктомированных животных. // Докл. РАН, 2003. Т. 393. С. 559-561.

Саранцева С.В., Шварцман А.Л. Моделирование нейропатологических процессов при болезни Альцгеймера и методов их коррекции на Drosophila melanogaster // Нейродегенеративные заболевания. Фундаментальные и прикладные аспекты. Ред. М.В. Угрюмов. М.: Наука, 2010. С. 350-355.

Alsop D.C., *Casement M., de Bazelaire C. et al.* Hippocampal hyperperfusion in Alzheimer's disease // Neuroimage. 2008. Vol. 42. № 4. P. 1267-1274.

Almeida O.P., *Flicker L.* Association between hormone replacement therapy and dementia: is it time to forget? // Int. Psychogeriatr. 2005. Vol. 17. № 2. P. 155-164.

Andreeva L.I., Shabanov P.D., Margulis B.A. Exogenous heat shock protein with a molecular weight of 70 kDa changes behavior in white rats..// Dokl. Biol. Sci. 2004. Vol. 394. P 34-37.

Apelt J., *Bigl M., Wunderlich P. et al.* Aging-related increase in oxidative stress correlates with developmental pattern of beta-secretase activity and beta-amyloid plaque formation in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer-like pathology // Int. J. Dev. Neurosci. 2004. Vol. 22. № 7. P. 475-484.

Arendt T., *Holzer M., Gärtner U. et al.* Aberrancies in signal transduction and cell cycle related events in Alzheimer's disease // J. Neural. Transm. Suppl. 1998. Vol. 54. P. 147-158.

Atwood C.S., Obrenovich M.E., Liu T. et al. Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta // Brain. Res. Rev. 2003. Vol. 43. № 1. P. 1-16.

Bizon J.L., *Gallagher M.* More is less: neurogenesis and age-related cognitive decline in long-evans rats // Sci. Aging. Knowledge. Environ. 2005. Vol. 16. № 7. P. 2.

Bobkova N.V., Nesterova I.V., Medvinskaya N.I. et al. Possible role of olfactory system in Alzheimer's disease genesis // Alzheimer's and Parkinson's disease – AD/PD. Eds. L. Hanin, A. Fisher. Monduzzi. Medimond. 2005. P. 91-95.

Bobkova N.V., Samokhin A.N., Medvinskaya N.I. et al. Neuronal repairing prevents alzheimer's type neurodegeneration // Alzheimer's and Dementia. 2006. Vol. 2. № 3. P. 473.

Bobkova N., Guzhova I., Margulis B. et al. Dynamics of endogenous Hsp70 synthesis in the brain of olfactory bulbectomized mice // Cell. Stress Chaperones. 2013. Vol. 18. № 1. P. 109-118.

Bobkova N.V., Garbuz D.G., Nesterova I.V. et al. Therapeutic Effect of Exogenous Hsp70 in Mouse Models of Alzheimer's Disease // J. Alzheimers. Dis. 2014. Vol. 38. № 2. P. 425-435.

Brody D.L., Magnoni S., Schwetye K.E. et al. Amyloid-β Dynamics Correlate with Neurological Status in the Injured Human Brain // Science. 2008. Vol. 321. P. 1221-1224.

Calabrese V., *Bates T.E., Stella A.M.* NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance // Neurochem. Res. 2000. Vol. 25. № 9-10. P. 1315-1341.

Castegna A., *Aksenov M., Thongboonkerd V. et al.* Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Part II: dihydropyrimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71 // J. Neurochem. 2002. Vol. 82. № 6. P. 1524-1532.

Castellani R.J., *Lee H.G., Zhu X. et al.* Alzheimer disease pathology as a host response // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2008. Vol. 67. № 6. P. 523-531.

Christensen H., *Batterham P.J., Mackinnon A.J. et al.* The association of APOE genotype and cognitive decline in interaction with risk factors in a 65-69 year old community sample // BMC Geriatr. 2008. Vol. 14. № 8. P. 14.

Cirrito J.R., *Yamada K.A., Finn M.B. et al.* Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid-beta levels in vivo // Neuron. 2005. Vol. 48. № 6. P. 913-922.

Clément J.P. Risk factors and protective factors of the insanities // Morphologie. 2007. Vol. 91. № 295. P. 207-220.

Cotman C.W. Apoptosis decision cascades and neuronal degeneration in Alzheimer's disease // Neurobiol. Aging. 1998. Vol. 19. № 1. Suppl. S. 29-32.

Counts S.E., He B., Che S. et al. Galanin hyperinnervation upregulates choline acetyltransferase expression in cholinergic basal forebrain neurons in Alzheimer's disease // Neurodegener. Dis. 2008. Vol. 5. № 3-4. P. 228-231.

Counts S.E., *He B., Che S. et al.* Alpha7 nicotinic receptor up-regulation in cholinergic basal forebrain neurons in Alzheimer disease // Arch. Neurol. 2007. Vol. 64. № 12. P. 1771-1776.

Craig M.C., *Maki P.M., Murphy D.G.* The Women's Health Initiative Memory Study: findings and implications for treatment // Lancet. Neurol. 2005. Vol. 4. № 3. P. 190-194.

D'Andrea M.R., *Nagele R.G.* Targeting the alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor to reduce amyloid accumulation in Alzheimer's disease pyramidal neurons // Curr. Pharm. Des. 2006. Vol. 12. № 6. P. 677-684.

Dong H., *Goico B., Martin M. et al.* Modulation of hippocampal cell proliferation, memory, and amyloid plaque deposition in APPsw (Tg2576) mutant mice by isolation stress // Neuroscience. 2004. Vol. 127. № 3. P. 601-609.

Dou F., *Netzer W.J., Tanemura K. et al.* Chaperones increase association of tau protein with microtubules // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. Vol. 100. № 2. P. 721-726.

Ekimova I.V., Nitsinskaya L.E., Romanova I.V. et al. Exogenous protein Hsp70/Hsc70 can penetrate into brain structures and attenuate the severity of chemically-induced seizures // J. Neurochem. 2010. Vol. 115. № 4. P. 1035-1044.

Fiala M., *Cribbs D.H., Rosenthal M. et al.* Phagocytosis of amyloid-beta and inflammation: two faces of innate immunity in Alzheimer's disease // J. Alzheimers. Dis. 2007. Vol. 11. № 4. P. 457-463.

Gan L., *Qiao S., Lan X. et al.* Neurogenic responses to amyloid-beta plaques in the brain of Alzheimer's disease-like transgenic (pPDGF-APPSw, Ind) mice // Neurobiol Dis. 2008. Vol. 29. № 1. P. 71-80.

Garcia-Alloza M., *Tsang S.W., Gil-Bea F.J. et al.* Involvement of the GABAergic system in depressive symptoms of Alzheimer's disease // Neurobiol. Aging. 2006. Vol. 27. № 8. P. 1110-1117.

Gregory C.W., *Atwood C.S., Smith M.A. et al.* Antigonadotropins: a novel strategy to halt Alzheimer's disease progression // Curr. Pharm. Des. 2006. Vol. 12. № 6. P. 685-690.

Gurevich E.V., Alexandrova I.Y., Otmakhova N.A. et al. Effect of bulbectomy and subsequent antidepressant treatment on brain 5-HT/2 and 5-HT/1A receptors in mice // Pharmacol. Biochem. Behav. 1993. Vol. 45. P. 65-70.

Guzhova I.V., Arnholdt A.C., Darieva Z.A. et al. Effects of exogenous stress protein 70 on the functional properties of human promonocytes through binding to cell surface and internalization // Cell. Stress. Chaperones. 1998. Vol. 3. № 1. P. 67-77.

Han S.D., *Bondi M.W.* Revision of the apolipoprotein E compensatory mechanism recruitment hypothesis // Alzheimers. Dement. 2008. Vol. 4. № 4. P. 251-254.

Head E., *Lott I.T., Patterson D. et al.* Possible compensatory events in adult Down syndrome brain prior to the development of Alzheimer disease neuropathology: targets for nonpharmacological intervention // J. Alzheimers. Dis. 2007. Vol. 11. № 1. P. 61-76.

Holmes C., Boche D., Wilkinson D. et al. Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trail // Lancet. 2008. Vol. 372. № 9634. P. 216-223.

Hoogendijk W.J., *Meynen G., Feenstra M.G. et al.* Increased activity of stress-regulating systems in Alzheimer disease // Tijdschr. Gerontol. Geriatr. 2001. Vol. 32. № 1. P. 17-23.

Iacono D., *O'Brien R., Resnick S.M. et al.* Neuronal hypertrophy in asymptomatic Alzheimer disease // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2008. Vol. 67. № 6. P. 578-589.

Jin K., *Galvan V., Xie L. et al.* Enhanced neurogenesis in Alzheimer's disease transgenic (PDGF-APPSw,Ind) mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004a. Vol. 101. № 36. P. 13363-13367.

Jin K., *Peel A.L., Mao X.O. et al.* Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004b. Vol. 101. № 1. P. 343-347.

Kakimura J., *Kitamura Y., Takata K. et al.* Microglial activation and amyloid-beta clearance induced by exogenous heat-shock proteins // FASEB J. 2002. Vol. 16. № 6. P. 601-603.

Kato T., *Yokouchi K., Fukushima N. et al.* Continual replacement of newly-generated olfactory neurons in adult rats // Neurosci. Lett. 2001. Vol. 307. № 1. P. 17-20.

Kemppainen N.M., *Aalto S., Karrasch M. et al.* Cognitive reserve hypothesis: Pittsburgh Compound B and fluorodeoxyglucose positron emission tomography in relation to education in mild Alzheimer's disease // Ann. Neurol. 2008. Vol. 63. № 1. P. 112-118.

Klein S.D., Brüne B. Heat-shock protein 70 attenuates nitric oxide-induced apoptosis in RAW macrophages by preventing cytochrome c release // Biochem. J. 2002. Vol. 362. № 3. P. 635-641.

Kudva Y.C., *Hiddinga H.J., Butler P.C. et al.* Small heat shock proteins inhibit in vitro A beta(1-42) amyloidogenesis // FEBS Lett. 1997. Vol. 416. № 1. P. 117-121.

Lee H.G., *Perry G., Moreira P.I. et al.* Tau phosphorylation in Alzheimer's disease: pathogen or protector? // Trends. Mol. Med. 2005. Vol. 11. № 4. P. 164-169.

Lee K.H., Im S.A., Oh D.Y. et al. Prognostic significance of bcl-2 expression in stage III breast cancer patients who had received doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel as adjuvant chemotherapy // BMC Cancer. 2007. Vol. 12. № 7. P. 63.

Leuba G., *Walzer C., Vernay A. et al.* Postsynaptic density protein PSD-95 expression in Alzheimer's disease and okadaic acid induced neuritic retraction // Neurobiol. Dis. 2008. Vol. 30. № 3. P. 408-419.

López-Toledano M.A., *Shelanski M.L.* Increased neurogenesis in young transgenic mice overexpressing human APP(Sw, Ind) // J. Alzheimers. Dis. 2007. Vol. 12. № 3. P. 229-240.

Ma K.C. Alzheimer-type I astrogliopathy (AIA) and its implications for dynamic plasticity of astroglia: a historical review of the significance of AIA // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 2001. Vol. 60. № 2. P. 121-131.

Magrané J., *Smith R.C., Walsh K. et al. H*eat shock protein 70 participates in the neuroprotective response to intracellularly expressed beta-amyloid in neurons // J. Neurosci. 2004. Vol. 24. № 7. P. 1700-1706.

Mahley R.W., *Weisgraber K.H., Huang Y.* Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. Vol. 103. № 15. P. 5644-5651.

Mattson M.P., *Maudsley S., Martin B.* BDNF and 5-HT: a dynamic duo in age-related neuronal plasticity and neurodegenerative disorders // Trends. Neurosci. 2004. Vol. 27. № 10. P. 589-594.

McDonald H.Y., *Wojtowicz J.M.* Dynamics of neurogenesis in the dentate gyrus of adult rats // Neurosci. Lett. 2005. Vol. 385. № 1. P. 70-75.

Middei S., *Restivo L., Caprioli A. et al.* Region-specific changes in the microanatomy of single dendritic spines over time might account for selective memory alterations in ageing hAPPsweTg2576 mice, a mouse model for Alzheimer disease // Neurobiol. Learn. Mem. 2008. Vol. 90. № 2. P. 467-471.

Mokrushin A.A., P*avlinova L.I., Guzhova I.V. et al.* Effects of exogenous heat shock protein (Hsp70) on glutaminergic synaptic transmission in rat olfactory cortex in vitro // Dokl. Biol. Sci. 2004. Vol. 395. P. 118-120.

Moreira P.I., *Zhu X., Liu Q. et al.* Compensatory responses induced by oxidative stress in Alzheimer disease // Biol. Res. 2006. Vol. 39. № 1. P. 7-13.

Moreira P.I., *Santos M.S., Oliveira C.R. et al.* Alzheimer disease and the role of free radicals in the pathogenesis of the disease CNS // Neurol. Disord. Drug. Targets. 2008. Vol. 7. № 1. P. 3-10.

Nagele R.G., Wegiel J., Venkataraman V. et al. Contribution of glial cells to the development of amyloid plaques in Alzheimer's disease // Neurobiol. Aging. 2004. Vol. 25. № 5. P. 663-674.

Nalivaeva N.N., *Fisk L., Kochkina E.G. et al.* Effect of hypoxia/ischemia and hypoxic preconditioning/reperfusion on expression of some amyloid-degrading enzymes / Ann. NY. Acad. Sci. 2004. Vol. 1035. P. 21-33.

Nordberg A. Neuroreceptor changes in Alzheimer disease // Cerebrovasc Brain. Metab. Rev. 1992. Vol. 4. № 4. P. 303-328.

Nitsch R.M., *Deng M., Growdon J.H. et al.* Serotonin 5-HT2a and 5-HT2c receptors stimulate amyloid precursor protein ectodomain secretion // J Biol. Chem. 1996. Vol. 271. № 8. P. 4188-4194.

Palop J.J., Chin J., Roberson E.D. et al. Aberrant excitatory neuronal activity and compensatory remodeling of inhibitory hippocampal circuits in mouse models of Alzheimer's disease // Neuron. 2007. Vol. 55. № 5. P. 697-711.

Pawlak J., *Brito V., Küppers E. et al.* Regulation of glutamate transporter GLAST and GLT-1 expression in astrocytes by estrogen // Brain. Res. Mol. Brain. Res. 2005. Vol. 138. № 1. P. 1-7.

Pollio G., *Hoozemans J.J., Andersen C.A. et al.* Increased expression of the oligopeptidase THOP1 is a neuroprotective response to Abeta toxicity // Neurobiol. Dis. 2008. Vol. 31. № 1. P. 145-158.

Rissman R.A., *De Blas A.L., Armstrong D.M.* GABA(A) receptors in aging and Alzheimer's disease // J. Neurochem. 2007. Vol. 103. № 4. P. 1285-1292.

Riudavets M.A., Iacono D., Resnick S.M. et al. Resistance to Alzheimer's pathology is associated with nuclear hypertrophy in neurons // Neurobiol. Aging. 2007. Vol. 28. № 10. P. 1484-1492.

Rogaev E.I. Genomics of behavioral diseases // Front Genet. 2012. Vol. 3. P. 45.

Scheff S.W., Price D.A. Alzheimer's disease-related alterations in synaptic density: neocortex and hippocampus // J. Alzheimers Dis. 2006. Vol. 9. № 3. Suppl. P. 101-115.

Sluimer J.D., Vrenken H., Blankenstein M.A. et al. Whole-brain atrophy rate in Alzheimer disease: identifying fast progressors // Neurology. 2008. Vol. 70. № 19. Pt 2. P. 1836-1841.

Sompol P., *Ittarat W., Tangpong J. et al.* A neuronal model of Alzheimer's disease: an insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury // Neuroscience. 2008. Vol. 153. № 1. P. 120-130.

Szot P., *White S.S., Greenup J.L. et al.* Changes in adrenoreceptors in the prefrontal cortex of subjects with dementia: evidence of compensatory changes // Neuroscience. 2007. Vol. 146. № 1. P. 471-480.

Truchot L., *Costes S.N., Zimmer L. et al.* Up-regulation of hippocampal serotonin metabolism in mild cognitive impairment // Neurology. 2007. Vol. 69. № 10. P. 1012-1017.

Ujiie M., *Dickstein D.L., Carlow D.A. et al.* Blood-brain barrier permeability precedes senile plaque formation in an Alzheimer disease model // Microcirculation. 2003. Vol. 10. № 6. P. 463-470.

Xiao Y., *Shan K.R., Guan Z.Z.* Effect of beta-amyloid peptides on alpha-7 nicotinic receptor status in astrocytes and neurons, and its relationship to pathogenesis of Alzheimer's disease // Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi. 2006. Vol. 35. № 8. P. 462-466.

Watson D., *Castaño E., Kokjohn T.A. et al.* Physicochemical characteristics of soluble oligomeric Abeta and their pathologic role in Alzheimer's disease // Neurol. Res. 2005. Vol. 27. № 8. P. 869-881.

Webber K.M., *Casadesus G., Atwood C.S. et al.* Gonadotropins: a cohesive gender-based etiology of Alzheimer disease // Mol. Cell. Endocrinol. 2007. Vol. 260-262. P. 271-275.

Wyss-Coray T., Loike J.D., Brionne T.C. et al. Adult mouse astrocytes degrade amyloid-beta in vitro and in situ // Nat. Med. 2003. Vol. 9. № 4. P. 453-457.

Yee W.M., *Frim D.M., Isacson O.* Relationships between stress protein induction and NMDA-mediated neuronal death in the entorhinal cortex // Exp. Brain. Res. 1993. Vol. 94. № 2. P. 193-202.

Yin K.J., *Cirrito J.R., Yan P. et al.* Matrix metalloproteinases expressed by astrocytes mediate extracellular amyloid-beta peptide catabolism // J. Neurosci. 2006. Vol. 26. № 43. P. 10939-10948.

Yoo B.C., Seidl R., Cairns N., Lubec G. Heat-shock protein 70 levels in brain of patients with Down syndrome and Alzheimer's disease // J. Neural. Transm. Suppl. 1999. Vol. 57. P. 315-322.

Zhang Y., Champagne N., Beitel L.K. et al. Estrogen and androgen protection of human neurons against intracellular amyloid beta1-42 toxicity through heat shock protein 70 // J. Neurosci. 2004. Vol. 24. № 23. P. 5315-5321.

Zhuravin I.A., Dubrovskaya N.M., Vasilev D.S. et al. Epigenetic and pharmacological regulation of the amyloid-degrading enzyme neprilysin results in modulation of cognitive functions in mammals // Dokl. Biol. Sci. 2011. Vol.438. P. 145-148.

Нарушение активности мозга на модели болезни Альцгеймера

Е.А. Муганцева

Содержание

1. Механизмы болезни Альцгеймера
2. Влияние $А\beta_{25-35}$ на спектральные и корреляционные характеристики ЭЭГ взрослых и старых животных

1. Механизмы болезни Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера (БА) – наиболее распространенное нейродегенеративное заболевание людей пожилого и старческого возраста. Она характеризуется прогрессивным снижением памяти и развитием деменции (слабоумия). Агрегированный амилоидный β-пептид (1-42) ($А\beta_{1-42}$) играет ключевую роль в патогенезе БА. Гиппокамп и фронтальная кора поражаются на ранней стадии заболевания (Dickerson, Sperling, 2009; Haass, Selkoe, 2007; Grothe et al., 2009). Физиологические, клеточные и молекулярные механизмы БА во многом остаются неизвестными, несмотря на интенсивные исследования многих ведущих лабораторий мира. Отсутствуют методы лечения, которые эффективно задерживают развитие нейродегенеративного процесса и восстанавливают когнитивные процессы (Haass, Selkoe, 2007; Rafii, Aisen, 2009).

Симптомы БА многообразны. В их числе – постепенное снижение памяти и внимания, нарушение процессов мышления и способности к обучению, дезориентация во времени и пространстве, затруднения при подборе слов, трудности в общении, изменения личности. Однако кардинальными симптомами БА являются прогрессирующее ухудшение памяти и развитие деменции. Нарушение пространственной памяти является одним из наиболее ранних симптомов БА (Burgess et al., 2001). Симптомы деменции постепенно прогрессируют, приводя в конечном итоге к тому, что больной полностью утрачивает способность к самообслуживанию и погибает от присоединившегося заболевания. Процесс нейродегенерации и распада психики продолжается несколько лет. Вероятность развития патологии связывают с увеличением средней продолжительности жизни (в особенности в развитых странах). Считается, что после 85 лет риск достигает 50%.

При микроскопическом анализе головного мозга отмечаются два основных нейропатологических признака: сенильные бляшки и нейрофибриллярные узелки. Сенильные бляшки представляют собой плотные, сферические, диаметром 10–150 мкм, в большинстве случаев нерастворимые отложения β-амилоида и клеточ-

---

Сокращения: БА – болезнь Альцгеймера; МРТ – магнитно-резонансная томография; СОД – супероксиддисмутаза; Аβ – амилоидные пептиды; APP – предшественник амилоидного пептида.

ного материала внутри и снаружи нейронов (Гаврилова, 1990). Основу ядра амилоидной бляшки составляет патологический агрегированный Аβ, состоящий из 40 и 42 аминокислотных остатков и ряд дополнительных компонентов (аполипопротеин Е, остатки микроглии и др.).

Нейрофибриллярные узелки состоят из гиперфосфорилированного тау-белка. В норме этот белок связан с системой микротрубочек и поддерживает внутреннюю структуру нейрона.

С помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) показаны функциональные нарушения во фронтальной, височной и теменной областях неокортекса как у пациентов с мягкими когнитивными нарушениями, так и больных БА (Dickerson, Sperling, 2009). Первичные моторные и сенсорные зоны страдают в последнюю очередь.

Постепенное нарастание клинических симптомов БА происходит параллельно с увеличением зон поражения мозга (Braak, Braak, 1998). Нарушения в энторинальной коре и гиппокампе происходит на самых ранних стадиях заболевания (Dickerson, Sperling, 2009; Haass, Selkoe, 2007; Grothe et al., 2009). Уменьшение объема базального ядра Мейнерта, являющегося главным источником холинэргической иннервации неокортекса, показано у пациентов с БА и мягкими когнитивными нарушениями (Grothe et al., 2009).

У этих больных уменьшение поля Брокка и фронтальной области коры сопровождается нарушением общего когнитивного статуса, а уменьшение гиппокампа, энторинальной коры и ядра Мейнерта связано со снижением припоминания (Grothe et al., 2009). Дальнейшая атрофия гиппокампа приводит к более тяжелым расстройствам декларативной памяти.

В связи с тем, что гиппокамп играет ключевую роль в механизмах формирования декларативной памяти, которая нарушается на самой ранней стадии болезни Альцгеймера, проблема «гиппокамп и болезнь Альцгеймера» является одной из наиболее актуальных.

Первичные молекулярные нарушения нейродегенеративных заболеваний, включая БА, вызываются нарушением конформации специфических белков (Завлишин, Захарова, 2003). «Комформационные болезни» характеризуются изменением вторичной структуры белков, образованием β-структуры, агрегацией и полимеризацией полипептидных цепей. Этот процесс может быть обусловлен как экзогенными, так и эндогенными факторами.

При БА амилоидные пептиды (Аβ) образуются при амилоидогенном протеолизе большого (695–700 аминокислотных остатков) трансмембранного белка нейронов, «предшественника амилоидного пептида» (APP).

Функция APP и Аβ в норме до конца неизвестна (Рогаев, 1999, Grigorenko, Rogaev, 2007; Selkoe, 1998), что во многом затрудняет понимание молекулярных основ патологического процесса. В норме образование Аβ не приводит к развитию заболевания, поскольку в здоровой ткани мозга существует баланс между продукцией β-пептида и его удалением. Нарушение функции клеток, участвующих в его утилизации, может вести к накоплению β-амилоида в межклеточном пространстве. Однако в настоящее время механизмы подобного нарушения не ясны. Тем не

менее, образование Аβ-пептидов путем протеолиза APP было подтверждено как исследованиями на культуре клеток различного типа (Walsh et al., 2002), так и в опытах *in vivo* (McKee et al., 1998).

Расщепление APP осуществляется пресенилинами 1 и 2 – большими белками с трансмембранными доменами и внеклеточными петлями. Амилоидогенный процессинг заключается в последовательном расщеплении APP β- и γ-секретазами на отдельные фрагменты β-амилоида. Конечный фрагмент, $Aβ_{1-42}$, образует растворимые олигомеры, амилоидные фибриллы и бляшки и оказывает сильное нейротоксическое действие (Storey, Cappai, 1999; Wilson et al., 1999; Walsh, Selkoe, 2007).

В норме расщепление APP осуществляется с помощью альфа-секретазы. Интересно, что α-секретаза расщепляет β-амилоидный пептид почти посередине между сайтами секретаз β и γ. Путь расщепления APP с помощью β- и γ-секретаз является патогенным. Важное значение имеют генетически детерминированные изменения в пресенилинах 1 и 2, которые являются катализатором и составляют часть протеазного комплекса γ-секретазы (Ikeuchi et al., 2003).

У здоровых людей растворимая форма Аβ обнаруживается в цереброспинальной жидкости в наномолярных концентрациях; фрагмент $Aβ_{1-40}$ составляет 90%, а $Aβ_{1-42}$ – 10% (Tran et al., 2002). Роль APP и Аβ в норме остается неизвестной (Рогаев, 1999; Selkoe, 1998).

Согласно одной из гипотез, амилоидный каскад запускается вследствие постепенных изменений уровня $Aβ_{40/42}$ в мозге. Этот уровень может повышаться из-за увеличения продукции и нарушения расщепления Аβ. В частности, соотношение Аβ42/Аβ40 может быть увеличено из-за мутаций в трех различных генах (предшественника амилоидного белка, пресенилина-1 и пресенилина-2), что является причиной семейной формы заболевания. Причина развития каскада при спорадической форме заболевания неизвестна.

Увеличение уровня $Aβ_{42}$ усиливает образование олигомеров, что ведет к изменениям синаптических функций. Параллельно формируются отложения $Aβ_{42}$ в паренхиме мозга, нефибриллярные депозиты пептида.

Как только образуются фибриллы, возникает воспалительный процесс, активируется микроглия и астроциты. Усиливается токсическое воздействие на синапсы и нейроны, снижается количество шипиков.

Поражение синапсов и нервных клеток ведет к нарушению ионного гомеостаза, в частности – повышению внутриклеточной концентрации кальция. При БА наблюдается повышенный уровень глутамата в синаптической щели, что оказывает токсичный эффект. На срезах гиппокампа и культуре микроглии было показано, что Аβ повышают выделение глутамата и тормозят его обратное поглощение. Увеличенная концентрация внеклеточного глутамата ведет к активации НМДА рецепторов и развитию эксайтотоксичности (Tran et al., 2002).

Параллельно происходит генерирование активных форм кислорода и развивается окислительный стресс, который вносит существенный вклад в механизмы заболевания (Jang, Surh, 2002; Perry et al., 2002). Антиоксидантная система предохраняет ткани от избыточного образования свободных кислородных радикалов. Ключевыми ферментами этой системы являются супероксиддисмутаза (СОД), ка-

талаза, глутатионпероксидаза. СОД, каталаза и глутатионпероксидаза содержатся не только в цитоплазме, но и в митохондриях, где образуется большинство внутриклеточных свободных радикалов (Lawrence, Burk, 1976).

Биохимические исследования показали, что при БА в коре и гиппокампе значительно снижается уровень ацетилтхолинтрансферазы, ключевого фермента синтеза ацетилхолина. Снижение активности ацетилхолинтрансферазы считается надежным коррелятом тяжелой деменции при БА. Эти данные подтверждают гипотезу, что холинегические нейроны переднего мозга особенно ранимы при БА (Whitehouse et al, 1982).

Нейрофибриллярные сплетения вызывают нарушение аксонного транспорта, изменение активности клеточных киназ и фосфатаз. Повышенное фосфорилирование тау-белка при БА приводит к его агрегации, разрушению микротрубочек и нейрофиламентов, нарушению цитоскелета и внутриклеточного транспорта веществ в нейроне. В отличие от нормальных микротрубочек, имеющих правильную линейную форму, переплетения состоят из перекрученных белковых нитей. Это способствует накоплению фибриллярных отложений, которые в еще большей степени вызывают дисфункцию нейритов и тел нейронов.

Все эти события, в конечном счете, завершаются гибелью нервных клеток, прогрессирующим нарушением памяти, других когнитивных процессов и развитием деменции (Haass, Selkoe, 2007).

Существует несколько экспериментальных моделей БА *in vivo* для исследования механизмов заболевания и разработки способов его лечения. Трансгенные мыши – модели БА, значительно продвинули изучение молекулярных механизмов этого заболевания и разработку способов его лечения (Haase, Selkoe, 2007; Howlett, Richardson, 2009; Götz, Ittner, 2008). Однако ни одна из современных экспериментальных моделей БА не является универсальной.

Введение в центральную нервную систему (в желудочки мозга или непосредственно в мозг, гиппокамп или кору) агрегированного амилоидного β-пептида или его токсического фрагмента $A\beta_{25-35}$ позволяет исследовать его действие на когнитивные, физиологические, молекулярные процессы и изучать антиамилоидное действие лекарственных средств (Nitta, Nabeshima, 1996; Stepanichev et al., 2006; Klementiev et al., 2007; Manzano et al., 2009).

Одними из ранних симптомов БА являются прогрессирующие нарушения пространственной памяти (Burgess et al., 2001). При исследовании нарушений памяти на моделях БА во многих случаях наблюдаются мягкие нарушения памяти, что не соответствует клиническим данным. Характеристика нарушений когнитивных процессов является одним из узких мест в экспериментальных моделях БА (Koistinaho et al., 2001).

В последнее время исследование зависимости нарушения когнитивной деятельности от межнейронных взаимосвязей в структурах головного мозга вызывает повышенный интерес. По современным представлениям, взаимосвязь между нейронной активностью различных областей головного мозга лежит в основе когнитивной деятельности (Ливанов, 1972; Chailakhyan, 1990, 1998; Ivanitsky et al., 2009; Uhlhaas, Singer, 2006; Sirota et al, 2008). Предполагается, что механизмы на-

рушения памяти при БА связаны со снижением связи нейронной активности между различными областями мозга (Uhlhaas, Singer, 2006). Исследования, выполненные на людях, страдающих БА, показали ухудшение пространственной памяти и нарушение передачи информации между полушариями мозга (Delbeuck et al., 2003). Однако имеются лишь единичные работы, в которых авторы изучали осцилляторные процессы в неокортексе на экспериментальных моделях БА *in vivo* (Uhlhaas, Singer, 2006; Bokde et al., 2009). Не проводилось специальных исследований влияния центрального введения β-амилоида на осцилляторную активность и пространственную синхронизацию различных областей мозга.

При исследовании динамики ЭЭГ коры на трансгенных мышах с двойной мутацией APP/PS1 было показано снижение мощности осцилляций в диапозоне тетаритма (5 ГЦ) и увеличение мощности β- и γ-ритмов, но эти изменения не зависели от возраста. Эта модель характеризуется высоким уровнем β-амилоида l-42 и развитием амилоидных бляшек в возрасте 9 месяцев. Зависимости между изменением спектра ЭЭГ и уровнем накопления $Aβ_{40/42}$ не было найдено. Мутантные по APP мыши имели подобные изменения θ-, β- и γ-ритмов, как и APP/PC1 мыши. В отличие от этого, ЭЭГ PS1 мутантов не отличалось от контроля. Концентрация нерастворимого $Aβ_{40/42}$ была сильно увеличена у APP/PC1 мутантов. Растворимая форма $Aβ_{42}$ была обнаружена у мышей, мутантных по APP, APP/PC1 и по PS1, но в более низкой концентрации. Накопление β-амилоида в бляшках отмечалось у 13-месячных, но не у 8-месячных APP/PC1 мутантов. Таким образом, нарушения ЭЭГ коры не были связаны с уровнем β-амилоида в мозге (Wang et al, 2002).

Изучалось влияние неамилоидогенных производных APP, образованных α-секретазой, на электрофизиологические и цереброваскулярные процессы *in vivo* у взрослых крыс. Было показано, что кровоток в гиппокампе не изменялся, а наблюдалось снижение мощности низкочастотного θ-ритма в диапозоне 4–8 Гц и увеличение мощности δ-ритма в гиппокампе и теменной коре. Причина этого эффекта неизвестна (Sánchez-Alavez et al., 2007).

На бульбоэктомированных мышах показано перераспределение активности ЭЭГ во фронтальной коре: усиление θ-активности во фронтальной коре правого полушария и затылочной коре левого полушария. Во фронтальной коре правого полушария наблюдалось снижение активности в β1-диапозоне. Все эти изменения сопровождались нарушением пространственной памяти в водном лабиринте Морриса (Bobkova et al,, 2008).

Изучалось влияние $Aβ_{1-40}$ на септо-гиппокампальное строение и функции. $Aβ_{1-40}$ вводился в медиальное ядро септум. Иммуногистохимическим методом показано уменьшение числа холинергических и глутаматергических нейронов на 57 и 53%, соответственно. Снизилось число глутаматергических терминалий, ГАМКергические нейроны септума не пострадали. Регистрация гиппокампальных полевых потенциалов показала подавление мощности гиппокампального θ-ритма на 49% и уменьшение числа медленно разрежающихся септальных нейронов. Было установлено, что β-амилоид нарушает анатомию и физиологию медиального септального ядра и вызывает дисфункцию септо-гиппокампальных холинергических и глутама-

тергических систем и нарушение гиппокампального θ-ритма, который играет ключевую роль в процессах памяти (Colom et al., 2010).

М.Н. Ливановым показана важная роль пространственной синхронизации ритмов ЭЭГ в формировании функциональной связи между областями коры, вовлеченными в процесс обучения (Ливанов, 1972). По современным представлениям, взаимосвязь между нейронной активностью различных областей головного мозга лежит в основе когнитивной деятельности (Uhlhaas, Singer, 2006; Sirota et al., 2008). Предполагается, что наршушение памяти при БА связано с ослаблением связи между различными областями коры (Uhlhaas, Singer, 2006). В опытах *in vivo* на трансгенных мышах с повышенной экспрессией предшественника β-амилоидного пептида было показано, что бляшки нарушают возможность нейронов интегрировать и передавать информацию (Stern et al., 2004).

Исследование, выполненное на людях, страдающих БА, показали ухудшение эпизодической памяти и передачи информации между полушариями мозга (Delbeuck et al., 2003), увеличение активности ЭЭГ в θ- и δ-диапазонах, снижение в α-диапазоне, нарушение пространственной синхронизации в α-, β- и γ-диапазонах (Jeong, 2004). Данные МРТ обнаружили снижение функциональных связей между различными областями коры как у больных БА (Grady et al., 2001), так и у пациентов с повышенным риском БА (мягкие когнитивные нарушения) (Bokde et al., 2006).

2. Влияние $A\beta_{25-35}$ на спектральные и корреляционные характеристики ЭЭГ взрослых и старых животных

На ранней стадии БА нейродегенеративный процесс в первую очередь захватывает гиппокамп и ассоциативные области неокортекса (Mattson, 2004). Недавно были получены данные о том, что у людей, страдающих БА, нарушена пространственная синхронизация ЭЭГ разных областей коры (Grady et al., 2001). Однако на экспериментальных моделях БА *in vivo* этот вопрос не исследован.

Поэтому было изучено влияние в/ж введения $A\beta_{25-35}$ на спектрально-корреляционные характеристики ЭЭГ дорзального гиппокампа и фронтальной коры у взрослых и старых животных.

Эксперименты проводили по следующей схеме (рис. 1). Животным вживлялись канюли для введения веществ в латеральный желудочек мозга и электроды в дорзальный гиппокамп (поле CA1) и фронтальную кору.

Через 7 дней после операции в/ж вводился 0,9-процентный раствор NaCl и через неделю регистрировалась ЭЭГ, затем тому же животному вводился $A\beta_{25-35}$ и повторно проводилась запись ЭЭГ на 7-й, 14-й и 30-й день после его введения. Через месяц после инъекции $A\beta_{25-35}$ у этих же животных тестировалось пространственное обучение при случайном положении цели.

Спектральный анализ ЭЭГ дорзального гиппокампа (поле CA1) и фронтальной коры крыс показал следующее. В контрольных записях ЭЭГ как гиппокампа, так и фронтальной коры преобладал смешанный тип активности, наблюдался небольшой

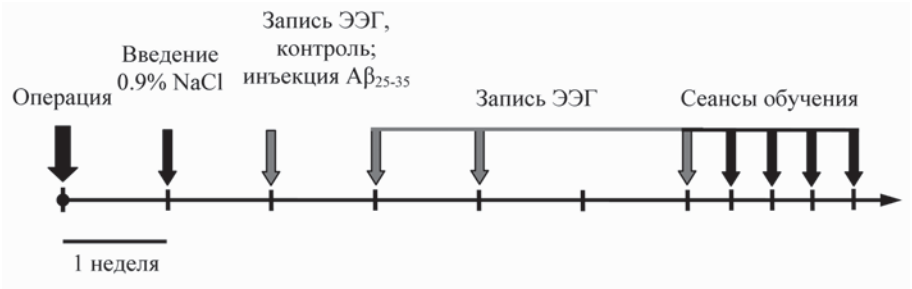


Рис. 1. Схема опыта

пик в δ-диапозоне (3 Гц). При этом на спектрограммах, соответствующих обеим структурам, отчетливо выделялся экстремум в θ-диапазоне (6 Гц). После введения $A\beta_{25-35}$ выраженность такой составляющей на обеих спектральных функциях достоверно уменьшилась, и сами функции приобрели более плоский вид (рис. 2А, Б).

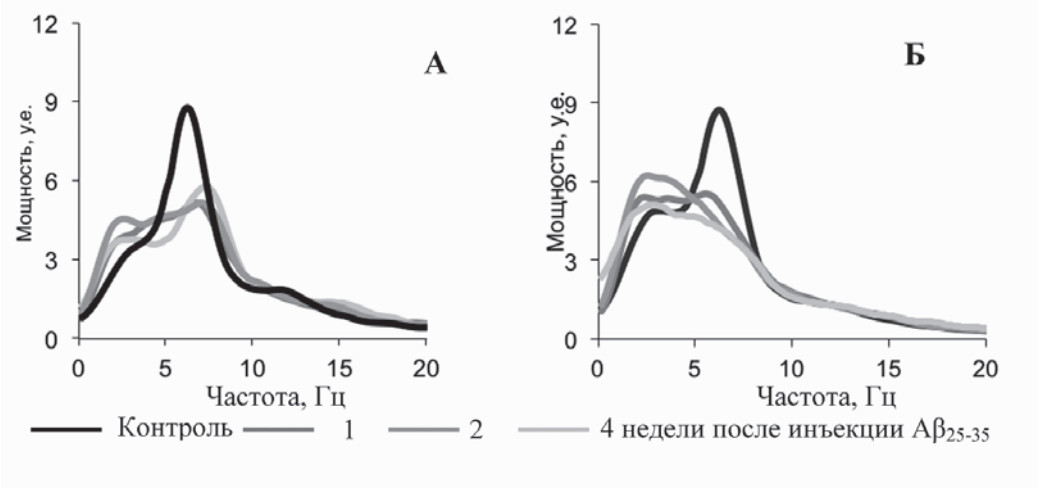


Рис. 2. Усредненные спектральные характеристики ЭЭГ гиппокампа (А) и фронтальной коры (Б) в контроле и через 1, 2 и 4 недели после введения $A\beta_{25-35}$, n=6

Корреляционный анализ ЭЭГ показал, что у взрослых и старых животных после внутрижелудочкового введения $A\beta_{25-35}$ значительно снижался коэффициент корреляции между дорзальным гиппокампом и фронтальной корой. На рис. 3А показан усредненный коэффициент корреляции у взрослых животных. Он достоверно снижался до 70–80% от контроля через неделю после введения $A\beta_{25-35}$ и сохранялся на сниженном уровне в течение месяца после инъекции.

У старых крыс в контроле наблюдалась положительная корреляция между ЭЭГ гиппокампа и фронтальной коры, но через неделю после в/ж введения $A\beta_{25-35}$ произошло достоверное ($p<0,05$, а в большинстве случаев и при $p<0,01$) снижение среднего значения коэффициента корреляции, вплоть до 30% (рис. 3Б). Эти данные показывают, что и у старых, и у взрослых животных на ранних стадиях действия

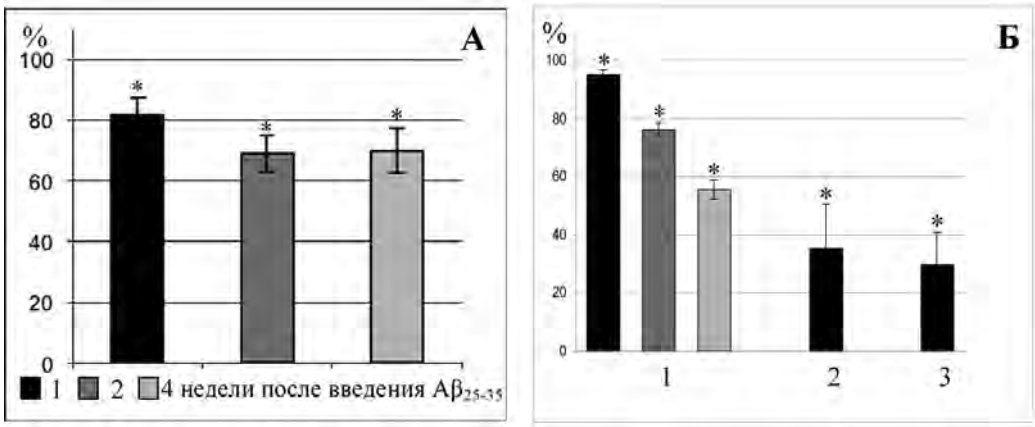


Рис. 3. Усредненные коэффициенты корреляции± стандартная ошибка между ЭЭГ гиппокампа и фронтальной коры через различные сроки после введения $А\beta_{25-35}$ у взрослых животных в процентах от контрольных значений, принятых за 100%, n=6 (А). Коэффициент корреляции у трех старых (20 месяцев) животных в процентах по отношению к контролю (Б). 1, 2, 3 – номера крыс. * – значимое различие коэффициента корреляции в контроле и опыте

$А\beta_{25-35}$ значительно снижалась корреляция между осцилляторной активностью дорзального гиппокампа и фронтальной корой.

Применение вейвлет-преобразования (wavelet) позволило исследовать динамику возникновения синхронизации и ритмической активности в структурах головного мозга крыс. Нами было проанализировано изменение коэффициента корреляции ЭЭГ между гиппокампом (поле СА1) и фронтальной корой в θ-диапозоне (4–12 Гц) в зависимости от времени и частоты через месяц после введения $А\beta_{25-35}$.

На рис. 4 представлен результат когерентного анализа ЭЭГ у взрослой крысы в контроле. Градиентом серого цвета указано распределение коэффициентов корреляциии между гиппокампом и фронтальной корой (белый – максимум, черный – минимум). Наличие точек белого цвета, группирующихся в полосе 5–8 Гц, является показателем высокой синхронизации гиппокампа и фронтальной коры на данной частоте в контроле (см. рис. 4А). На рис. 4Б коэффициент корреляции в контроле на частоте 6 Гц представлен в численном значении. Видно, что значение коэффициента колеблется около 0.8, что означает высокую синхронизацию полевых потенциалов гиппокампа и фронтальной коры.

Через месяц после введения $А\beta_{25-35}$ не наблюдалось высоких значений коэффициента корреляции. Обработка ЭЭГ-сигналов показала отсутствие долговременной корреляции вейвлет-коэффициентов в полосе частот 4–12 Гц. Это свидетельствует о нарушении пространственной синхронизации, дезорганизации и хаотичном характере ЭЭГ-активности. График изменения численного значения коэффициента корреляции между ЭЭГ гиппокампа и фронтальной коры подтверждает эти данные: коэффициент принимает значения от 0,3 до 0,6.

Таким образом, с помощью метода корреляции вейвлет-коэффициентов были выявлены моменты синхронизации ритмов ЭЭГ в полосе частот от 4 до 6 Гц, что

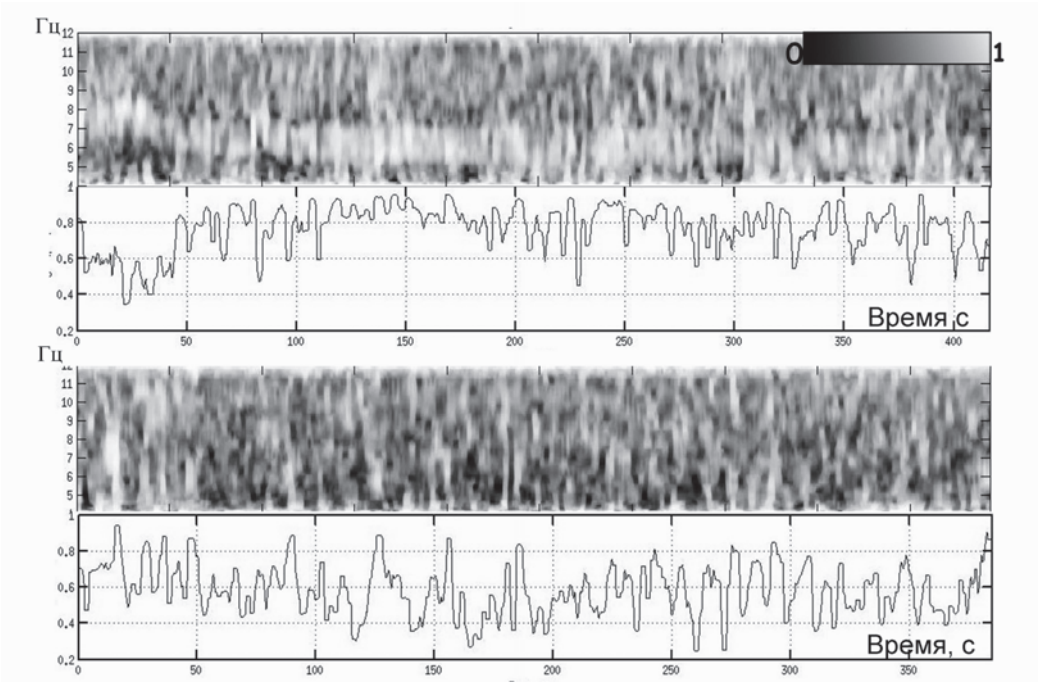


Рис. 4. Когерентность между ЭЭГ гиппокампа и фронтальной коры на частоте тета-ритма (4–12 Гц) у взрослого животного, полученная с помощью вейвлет-преобразования в контроле (А) и через месяц после введения $A\beta_{25-35}$ (В). Оттенками серого указано распределение корреляции вейвлет-коэффициентов (белый-максимум, черный-минимум). Коэффициенты корреляции на частоте 6 Гц в контроле (Б) и в опыте (Г)

соответствует низкочастотному θ-ритму в контроле и нарушение синхронизации через месяц после введения $A\beta_{25-35}$.

После окончания электроэнцефалографических экспериментов у взрослых животных было проанализировано обучение в водном лабиринте Морриса со случайным положением платформы. Опыты проходили через месяц после введения $A\beta_{25-35}$. Среднее значение и стандартная ошибка времени решения когнитивной задачи представлены на рис. 5.

В контроле наблюдалась типичная кривая обучения: время решения задачи сокращалось от сеанса к сеансу. Это служило показателем консолидации пространственной памяти. У опытных животных в течение 5 сеансов наблюдалась тенденция к обучению, но скорость обучения была сниженной по сравнению с контролем. Статистический анализ показал значимую разницу (при $p \leq 0{,}05$) во втором, третьем и пятом сеансах между опытной и контрольной группами. Особенно информативно значимое различие латентного времени в пятом сеансе.

Приведенные примеры ясно показывают, что у старых животных взаимодействие между гиппокампом и фронтальной корой было нарушено значительно сильнее, чем у взрослых крыс. Интересный результат заключается в том, что у всех

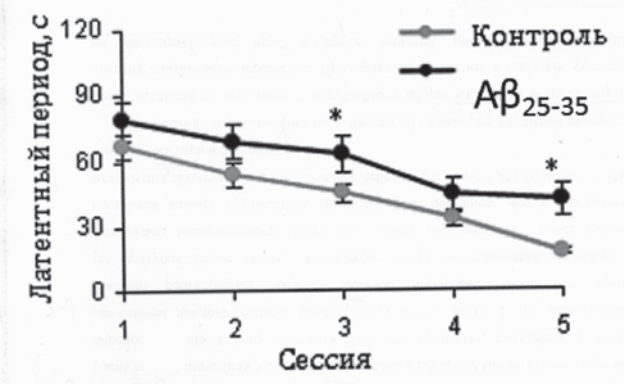


Рис. 5. Влияние в/ж введения $A\beta_{25-35}$ на время решения когнитивной вероятностной задачи в модифицированном водном лабиринте Морриса, среднее значение ± стандартная ошибка. Взрослые крысы (n=6/9 контроль/опыт, соответственно). * – различия в 3 и 5 сеансах между контрольными и опытными животными, $p<0,05$

взрослых животных с изменением осцилляторной активности гиппокампа и фронтальной коры, нарушением синхронности между этими структурами происходило ухудшение пространственного обучения при случайном положении цели.

Таким образом, введение Aβ25-35 не полностью нарушает, а замедляет (снижает скорость) пространственное обучение у взрослых крыс. Наши результаты согласуются с экспериментальными данными, согласно которым β-амилоид, введенный в желудочки мозга, нарушал память у крыс в V-лабиринте, но вызывал слабый дефицит пространственного обучения (Stepanov et al., 2007).

Нарушение когнитивных функций при спорадической форме БА обычно происходит после 70 лет на фоне общего физиологического старения организма. Но центральное введение β-амилоида на старых животных изучалось относительно редко. После хронического введения Aβ1-42 в латеральные желудочки мозга мышей в возрасте 2,5 и 9 месяцев наблюдалось нарушение пространственной памяти в тесте Морриса. У старых крыс дефицит пространственной памяти был особенно сильный. Это указывает на повышенную чувствительность старых животных к действию β-амилоида (Malm et al., 2006).

Нарушения осцилляторной активности и синхронизации электрических сигналов между различными областями мозга становятся одной из центральных проблем и начинают исследоваться на моделях болезни Альцгеймера (Uhlhaas, Singer, 2006; Bokde et al., 2009).

На моделях БА не изучался вопрос о связи пространственной синхронизации ЭЭГ и когнитивных функций. Поэтому мы провели исследование осцилляторной активности гиппокампа и фрональной коры и пространственной синхронизации электрической активности между этими структурами после центрального введения Aβ у взрослых и старых животных. Было показано подавление низкочастотного θ-ритма (4–6 Гц) в гиппокампе и фронтальной коре под действием β-амилоида. Эти изменения были зарегистрированы через неделю после в/ж введения $A\beta_{25-35}$ и

сохранялись в течение месяца. Эти результаты совпадают с данными, полученными на трансгенных мышах – моделях БА (APP/PS1, APP), где наблюдалось подавление мощности низкочастотного θ-ритма в коре (Wang et al., 2002). Недавно показано, что микроинъекция $A\beta_{1-40}$ в медиальное ядро септума подавляет гиппокампальный θ-ритм (Colom et al., 2010). По современным теориям θ-ритм играет ключевую роль в механизмах гиппокампа: фильтрации поступающей в мозг новой информации, селективном внимании, начальном этапе обучения (Bland, Colom, 1993; Vinogradova, 1995, 2001), ориентации в пространстве (Maurer, 2007). Снижение фоновой активности в θ-диапазоне является показателем нарушения функционального состояния гиппокампа. Эти изменения коррелируют с нарушением обработки новой информации, декларативной памяти и различения пространственных сигналов (Maurer, 2007; McNaughton et al., 2006). Ориентация в пространстве и направление движения тесно связаны с клетками-места в гиппокампе (McNaughton et al., 2006).

Было показано, что β-амилоидные олигомеры ингибируют долговременную потенциацию в гиппокампе млекопитающих (Haass, Selkoe, 2007). Образованные в клетках олигомеры β-амилоида снижают плотность дендритных шипиков в гиппокампальных срезах, что изменяет прохождение сигнала в пирамидных нейронах CA1 гиппокампа (Selkoe, 2008). Активность нейрональных сетей модулируется нейротрансмиттерными системами, такими как глутаматная, ацетилхолиновая, серотониновая, дофаминовая. На культуре гиппокампальных нейронов показано, что β-амилоидные олигомеры связываются с поверхностью нейрона, а именно – с синоптическими окончаниями дендритов. На этом основании В.Л. Клейн и соавторы предположили, что $A\beta_{42/43}$ является лигандом синапсов (Klein et al., 2004).

Подавление осцилляций в диапозоне 4-6 Гц в гиппокампе и коре связано со снижением активности септо-гиппокампальной холинергической системы, существенной для кодирования новой информации и формирования первых стадий памяти (Vinogradova, 1995, 2001; Hasselmo, 2006). β-амилоид оказывает негативное влияние на никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (в частности ά7nACh-рецепторы) (Turner, 2003; Albuquerque et al., 2009). Нарушение холинергической иннервации гиппокампа является одним из существенных проявлений патогенеза БА (McKay et al., 2007).

М.Н. Ливановым показана важная роль пространственной синхронизации ритмов ЭЭГ в формировании функциональной связи между областями коры, вовлеченными в процесс обучения. Особый интерес для понимания механизмов нервной деятельности имеют осцилляторные синхронизированные электрические процессы, регистрируемые на уровне ЭЭГ-потенциалов. Было установлено, что пространственная синхронизация в определенном частотном диапазоне ЭЭГ и когерентность этих процессов имеет определяющее значение для проведения возбуждения между различными отделами коры больших полушарий, а также между корой и подкорковыми структурами (Ливанов, 1972).

Нарушения осцилляторной активности и синхронизации электрических сигналов между различными областями мозга становятся одной из центральных проблем и начинают исследоваться на моделях болезни Альцгеймера (Uhlhaas, Singer, 2006; Bokde et al., 2009).

По современным представлениям, межнейронные взаимодействия структур головного мозга играют ведущую роль в механизмах когнитивной деятельности в норме и при нейродегенеративных заболеваниях, включая болезнь Альцгеймера (Uhlhaas, Singer, 2006; Bokde et al., 2009). Предполагается, что нарушение памяти при БА связано со снижением связи между различными областями коры (Uhlhaas, Singer, 2006). А. Стерн и соавторы (Stern et al., 2004) показали, что β-амилоидные бляшки нарушают кортикальную сеть нейронов. По-видимому, это происходит из-за изменения морфологии аксонов и дендритов нерастворимыми β-амилоидными агрегатами (Stern et al., 2004).

В работе впервые показано снижение пространственной синхронизации между гиппокампом и фронтальной корой на модели БА. Коэффициент корреляции в среднем снижался до 0,6 у взрослых и до 0,3 у старых животных. Важно подчеркнуть, что синхронизация между гиппокампом и неокортексом нарушалась в большей степени у старых животных, что коррелирует с ухудшением когнитивной деятельности в старческом возрасте.

Снижение корреляции ЭЭГ между гиппокампом и фронтальной корой сопровождалось нарушением пространственного обучения у взрослых животных. У старых крыс коэффициент кросскорреляции снизился гораздо сильнее, чем у взрослых животных. Такие изменения воспроизводят клиническую картину, наблюдаемую при БА, и могут служить основой для разработки экспериментальной модели деменции альцгеймеровского типа. Нарушение функциональной связи между этими структурами и подавление гиппокампального θ-ритма могут лежать в основе нарушения когнитивных процессов при болезни Альцгеймера.

Литература

Гаврилова С.И., Корсакова Н.К., Вавилов С.Б. Фармакотерапия. Болезни Альцгеймера: Миф или реальность // Журнал невропатол. и псих. им. С.С. Корсакова. 1990. № 90. С. 44-50.

Завлишин И.А., Захаров М.Н. Конформационные болезни // Журнал неврологии и психиатрии. 2003. № 1. С. 54-60.

Ливанов М.Н. Пространственная организация процессов головного мозга. М.: Наука, 1972. 181 с.

Рогаев Е. Генетические факторы и полигенные модели болезни Альцгеймера // Генетика. 1999. № 35. С. 1558-1571.

Albuquerque E.X., Pereira E.F., Alkondon M., Rogers S.W. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function // Physiol. Rev. 2009. Vol. 89. № 1. P. 73-120.

Bland B.H., Colom L.V. Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex // Prog. Neurobiol. 1993. Vol. 41. № 2. P. 157-208.

Bobkova N., Vorobyov V., Medvinskaya N., Aleksandrova I., Nesterova I. Interhemispheric EEG differences in olfactory bulbectomized rats with different cognitive abilities and brain beta-amyloid levels // Brain. Res. 2008. Vol. 1232. P. 185-194.

Bokde A.L., Lopez-Bayo P., Meindl T. et al. Functional connectivity of the fusiform gyrus during a face-matching task in subjects with mild cognitive impairment // Brain. 2006, Vol. 129. Pt. 5, P. 1113-1124.

Bokde A.L., Ewers M., Hampel H. Assessing neuronal networks: understanding Alzheimer's disease // Prog. Neurobiol. 2009. Vol. 89. № 2. P. 125-133.

Braak H., Braak E. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease // J. Neural. Transm. Suppl. 1998. Vol. 53. P. 127-140.

Burgess N., Becker S., King J.A., O'Keefe J. Memory for events and their spatial context, models and experiments // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2001. Vol. 356. № 1413. P. 1493-1503.

Chailakhyan L.M. Ligand-receptor and junction-mediated cell-cell interactions: comparison of the two principles // Differentiation. 1990. Vol. 45. № l. P. l-6. Review.

Chailakhyan L.M. Intercellular interactions as a basis for the expedient behaviour of multicellular systems // Membr. Cell Biol. 1998. Vol. 11. № 6. P. 693-700.

Colom L.V., Castañeda M.T., Bañuelos C. et al. Medial septal beta-amyloid 1-40 injections alter septohippocampal anatomy and function // Neurobiol. Aging. 2010. Vol. 31. № 1. P. 46-57.

Delbeuck X., Van der Linden M., Collette F. Alzheimer's disease as a disconnection syndrome? // Neuropsychol. Rev. 2003. Vol. 13. P. 79-92.

Dickerson B.C., Sperling R.A. Large-scale functional brain network abnormalities in Alzheimer's disease: insights from functional neuroimaging // Behav. Neurol. 2009. Vol. 21. № 1. P. 63-75.

Götz J., Ittner L.M. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia // Nat. Rev. Neurosci. 2008. Vol. 9. № 7. P. 532-544.

Grady C.L., Furey M.L., Pietrini P., Horwitz B., Rapoport S.I. Altered brain functional connectivity and impaired short-term memory in Alzheimer's disease // Brain. 2001. Vol. 124. Pt. 4. P. 739-56.

Grigorenko A.P., Rogaev E.I. Molecular basics of Alzheimer's disease // Mol. Biol. (Mosk). 2007. Vol. 41. № 2. P. 331-345.

Grothe M., Zaborszky L., Atienza M. et al. Reduction of basal forebrain cholinergic system parallels cognitive impairment in patients at high risk of developing alzheimer's disease // Cereb. Cortex. 2009.

Haass C., Selkoe D.J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2007. Vol. 8. P. 101-112.

Hasselmo M.E. The role of acetylcholine in learning and memory // Curr. Opin. Neurobiol. 2006. Vol. 16. № 6. P. 710-715.

Howlett D.R., Richardson J.C. The pathology of APP transgenic mice: a model of Alzheimer's disease or simply overexpression of APP? // Histol. Histopathol. 2009. Vol. 24. № 1. P. 83-100.

Ikeuchi T., Dolios G., Kim S.H., Wang R., Sisodia S.S. Familial Alzheimer disease-linked presenilin 1 variants enhance production of both Abeta 1-40 and Abeta 1-42 peptides that are only partially sensitive to a potent aspartyl protease transition state inhibitor of «gamma-secretase» // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. № 9. P. 7010-7018.

Ivanitsky A.M., Ivanitsky G.A., Sysoeva O.V. Brain science: on the way to solving the problem of consciousness // Int. J. Psychophysiol. 2009. Vol. 73. № 2. P. 101-108.

Jang J.H., Surh Y.J. Beta-Amyloid induces oxidative DNA damage and cell death through activation of c-Jun N terminal kinase // Ann. NY. Acad. Sci. 2002. Vol. 973. P. 228-236.

Jeong J. EEG dynamics in patients with Alzheimer's disease // Clin. Neurophysiol. 2004. Vol. 115. P. 1490-1505

Klein W.L., Stine W.B., Teplow Jr. Small assemblies of unmodified amyloid beta-protein are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease // Neurobiol. Aging. 2004. Vol. 25. № 5. P. 569-580.

Klementiev B., Novikova T., Novitskaya V. et al. A neural cell adhesion molecule-derived peptide reduces neuropathological signs and cognitive impairment induced by Abeta (25-35) // Neuroscience. 2007. Vol. 145. P. 209-224

Koistinaho M., Ort M., Cimadevilla J.M. et al. Specific spatial learning deficits become severe with age in beta-amyloid precursor protein transgenic mice that harbor diffuse beta-amyloid deposits but do not form plaques // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98. № 25. P. 14675-14680.

Lawrence R.A., Burk R.F. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1976. Vol. 71. № 4. P. 952-958.

Malm T., Ort M., Tähtivaara L., Jukarainen N. et al. Beta-Beta-Amyloid infusion results in delayed and age-dependent learning deficits without role of inflammation or beta-amyloid deposits // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. Vol. 103. № 23. P. 8852-8857.

Manzano S., González J., Marcos A., Payno M., Villanueva C., Matías-Guiu J. Experimental models in Alzheimer's disease // Neurologia. 2009. Vol. 24. № 4. P. 255-262.

Mattson M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease // Nature. 2004. Vol. 430. № 7000. P. 631-9. Review.

Maurer A.P., McNaughton B.L. Network and intrinsic cellular mechanisms underlying theta phase precession of hippocampal neurons // Trends Neurosci. 2007. Vol. 30. № 7. P. 325-333.
McKay B.E., Placzek A.N., Dani J.A. Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors // Biochem. Pharmacol. 2007. Vol. 74. № 8. P. 1120-1133.
McKee A.C. et al. The neurotoxicity of amyloid beta protein in aged primates // Amyloid. 1998. Vol. 5. № 1. P. 1-9.
McNaughton N., Ruan M., Woodnorth M.A. Restoring theta-like rhythmicity in rats restores initial learning in the Morris water maze // Hippocampus. 2006. Vol. 16. № 12. P. 1102-10.
Nitta A., Nabeshima T. Experimental techniques for developing new drugs acting on dementia (10)-Alzheimer's disease animal model induced by beta-amyloid protein // Nihon. Shinkei. Seishin .Yakurigaku Zasshi. 1996. Vol. 16. № 3. P. 85-90.
Perry G., Cash A.D., Smith M.A. Alzheimer Disease and Oxidative Stress // J. Biomed. Biotechnol. 2002. Vol. 2. № 3. P. 120-123.
Rafii M.S., Aisen PS. Recent developments in Alzheimer's disease therapeutics // BMC Med. 2009. Vol. 7. P. 7.
Sánchez-Alavez M., Chan S.L., Mattson M.P., Criado J.R. Electrophysiological and cerebrovascular effects of the alpha-secretase-derived form of amyloid precursor protein in young and middle-aged rats // Brain Res. 2007. Vol. 1131. № 1. P. 112-117.
Selkoe D.J. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy // Physiol. Rev. 1998. Vol. 81. P. 741-766.
Selkoe D.J. Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior // Behav. Brain Res. 2008. Vol. 192. № 1. P. 106-113.
Sirota A., Montgomery S., Fujisawa S., Isomura Y., Zugaro M., Buzsáki G. Entrainment of neocortical neurons and gamma oscillations by the hippocampal theta rhythm // Neuron. 2008. Vol. 60. № 4. P. 683-697.
Stepanichev M.Y., Zdobnova I.M., Zarubenko I.I., Lazareva N.A., Gulyaeva N.V. Studies of the effects of central administration of beta-amyloid peptide (25-35): pathomorphological changes in the Hippocampus and impairment of spatial memory // Neurosci. Behav. Physiol. 2006. Vol. 36. № 1. P. 101-106.
Stepanov I.I., Kuznetsova N.N., Klement'ev B.I., Sapronov N.S. Effects of intracerebroventricular administration of beta-amyloid on the dynamics of learning in purebred and mongrel rats // Neurosci. Behav. Physiol. 2007. Vol. 37. № 6. P. 583-590.
Stern A., Bacskai B.J., Hickey G. A., Attenello F.J., Lombardo J.A., Hyman B.T. Cortical synaptic integration in vivo is disrupted by Amyloid-β plaques // J. Neuroscience. 2004. Vol. 24. № 19. 4535-4540.
Storey E., Cappai R. The amyloid precursor protein of Alzheimer's disease and the Abeta peptide // Neuropathol. Appl. Neurobiol. 1999. Vol. 25. № 2. P. 81-97.
Tran M.H., Yamada K., Nabeshima T. Amyloid beta-peptide induces cholinergic dysfunction and cognitive deficits: a minireview // Peptides. 2002. Vol. 23. № 7. P. 1271-1283.
Turner P.R. Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory // Prog. Neurobiol. 2003. Vol. 70. № 1. P. 1-32.
Uhlhaas P.J., Singer W. Neural Synchrony in Brain Review Disorders, Relevance for Cognitive Dysfunctions and Pathophysiology // Neuron. 2006. Vol. 52. P. 155-168.
Vinogradova O.S. Expression, control, and probable functional significance of the neuronal thete-rhythm // Progr. in Neurobiol. 1995. Vol. 45. P. 523-583.
Vinogradova O.S. Hippocampus as comparator, role of the two input and two output systems of the hippocampus in selection and registration of information // Hippocampus. 2001. Vol. 11. № 5. P. 578-598.
Walsh D.M., Selkoe D.J. A-beta oligomers – a decade of discovery // J. Neurochem. 2007. Vol. 101. № 5. P. 1172-1184.
Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V. et al. Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo* // Nature. 2002. Vol. 416. 535-539.
Wang J., Ikonen S., Gurevicius K., Groen T., Tanila H. Alteration of cortical EEG in mice carrying mutated human APP transgene // Brain. Research. 2002. Vol. 943. P. 181-190.
Whitehouse P.J., Struble R.G., Clark A.W., Price D.L. Alzheimer disease: plaques, tangles, and the basal forebrain // Ann. Neurol. 1982. Vol. 12. № 5. P. 494.
Wilson C.A., Doms R.W., Lee V.M. Intracellular APP processing and A beta production in Alzheimer disease // J. Neuropathol. Exp. Neurol. 1999. Vol. 58. № 8. P. 787-794.

Изучение механизмов когнитивных дисфункций с использованием модели пренатальной гипоксии

И.А. Журавин, Д.С. Васильев, Н.М. Дубровская, Д.И Козлова, Е.Г. Кочкина, С.А. Плеснева, Н.Л. Туманова, О.С. Алексеева, А.Н. Ветош, Н.Н. Наливаева

Содержание

1. Введение
2. Когнитивные дисфункции после действия пренатальной гипоксии
3. Механизмы действия пренатальной гипоксии на развитие кортикальных отделов головного мозга
4. Изменения структурно-функциональной организации нервной ткани в постнатальном онтогенезе после пренатальной гипоксии
5. Роль каспаз в структурно-функциональных изменениях после пренатальной гипоксии
6. Синаптическая пластичность как основа адаптивных возможностей нейронных сетей
7. Нарушение межнейронного взаимодействия
8. Изменения на молекулярном и биохимическом уровнях
9. Заключение

1. Введение

Когнитивные дисфункции выражаются в нарушении наиболее сложных функций головного мозга, с помощью которых осуществляется процесс рационального познания мира и обеспечивается целенаправленное взаимодействие с ним. При этом изменяется восприятие, обработка и анализ информации, ее запоминание, хранение и обмен, а также построение и осуществление программы действий (Захаров, Яхно, 2005). Причинами когнитивных дисфункций могут являться нейродегенеративные заболевания, в частности болезнь Альцгеймера (БА), в результате которой происходит массовая гибель нейронов в кортикальных отделах головного мозга и нарушение межклеточного взаимодействия, вызванные различными метаболическими изменениями в нервной ткани.

Для успешного изучения механизмов возникновения БА и поиска стратегий ее профилактики и лечения большое значение имеет использование адекватных мо-

---

Сокращения: АХЭ – ацетилхолинэстераза; БА – болезнь Альцгеймера; БХЭ – бутирилхолинэстераза; ИДФ – инсулин-деградирующий фермент; МКС (MCI) – мягкое когнитивное снижение; НЕП – неприлизин; ЭКФ (ECE-1) – эндотелин-конвертирующий фермент; Аβ – амилоидный пептид; APP – белок-предшественник амилоидного пептида; EAAT – переносчик возбуждающих аминокислот; EGCG – эпигаллокатехингаллат; LTP – долговременная потенциация; PS– пресенилины; VAChT – везикулярный переносчик ацетилхолина.

делей тех состояний, которые наблюдаются в головном мозге при развитии этого заболевания. Традиционно основное внимание при создании моделей БА на животных фокусировалось на идентификации областей мозга и медиаторных систем, связанных с памятью. В этом отношении наибольшее внимание уделялось холинергической системе переднего мозга, которая претерпевает значительные изменения при БА (Schliebs, Arendt, 2011; Dumas, Newhouse, 2011).

В экспериментальной литературе был предложен ряд моделей дисфункций холинергической системы при БА, например при введении антагонистов мускариновых рецепторов (Flood, Cherkin, 1986), повреждении медиальной септальной области (McDonald, Overmier, 1998) или базальных ядер Мейнерта (Pepeu et al., 1986; Salamone et al., 1986), вызывающих снижение уровня АХТ и АХЭ в коре головного мозга. Во всех таких исследованиях было показано нарушение выполнения задач по обучению. Помимо этого было обнаружено, что воздействие на рецепторы фактора роста нерва крысы моноклональными антителами, конъюгированными с сапорином (192 IgG-saporin), приводит к потере холинергических нейронов и некоторым когнитивным расстройствам (Wiley et al, 1991). Экспериментальные данные, свидетельствующие о связи между патогенезом БА и нарушением системы инсулинового метаболизма в головном мозге, привели к развитию модели стрептозотоцинового диабета (Grunblatt et al., 2004; De la Monte, Wands, 2005). Помимо разрушения клеток поджелудочной железы, синтезирующих инсулин, введение стрептозотоцина приводило к развитию у крыс дефицита обучения и памяти, прогрессивной потери холинергических нейронов и нейродегенерации. Недавно также была разработана модель внутричерепного введения стрептозотоцина, которая в определенной степени моделирует нарушения, характерные для БА (Salkovic-Petrisic et al., 2013). Однако сведения относительно изменений содержания амилоидного пептида (Аβ) и тау-белка в мозгу таких крыс противоречивы (Grunblatt et al., 2004; Prickaerts et al., 1999; Salkovic-Petrisic et al., 2006). Более того, проводимые исследования показывают, что все эти модели не всегда адекватно отражают мнемонические дефициты, наблюдаемые на ранних стадиях БА.

До недавнего времени большое число исследований по моделированию патогенеза БА проводилось с использованием *i.c.* инъекций экзогенного Аβ, обладающего токсичностью как в растворенном, так и в агрегированном состояниях, и накопление которого в ткани мозга является одной из основных причин развития БА (Hardy, Selkoe, 2002; Walsh et al., 2002). Однако, несмотря на определенный прогресс в понимании ряда биохимических процессов, происходящих в ткани мозга при введении экзогенного Аβ, эта модель имеет ряд ограничений и не всегда воспроизводит симптомы когнитивных расстройств, характерных для БА (Takeda et al., 2009). Поскольку амилоидный пептид у большинства грызунов растворим и не формирует бляшки, а его токсичность не доказана, имеющиеся в настоящее время зоотропные модели БА основаны на использовании трансгенных животных (в основном мышей), экспрессирующих гены человека, в частности, белка предшественника амилоидного пептида (APP), пресенилинов (PS1 и PS2), а также тау-белка. Все они в разной степени воспроизводят основные признаки БА и характеризуются накоплением амилоидного пептида в нервной ткани, а также когнитивным дефи-

цитом (Hwang et al., 2005; Saura et al., 2005). Несмотря на явные физиологические ограничения, использование трансгенных насекомых, в частности *Drosophila*, довольно часто является полезным для выяснения роли определенного класса молекул в развитии патологии или для тестирования эффектов новых лекарственных препаратов (Newman et al., 2011; Zhu et al., 2014).

Использование трансгенных мышей с патологией метаболизма амилоидного пептида привело к углубленному пониманию процессов образования Аβ и роли растворимых Аβ олигомеров в патогенезе БА (Schaeffer et al., 2011; Morrissette et al., 2009; Cheng et al., 2007; Lesne et al., 2006). Так, было выявлено, что у многих APP трансгенных мышей патологические и функциональные изменения происходят до образования амилоидных бляшек (Schaeffer et al., 2011). В то время как у многих из этих трансгенных мышей образуются амилоидные бляшки и развиваются когнитивные нарушения, в ряде случаев у них не наблюдается другой признак БА, а именно – формирование внутриклеточных нейрофибриллярных клубков. Для воспроизведения обоих признаков была создана так называемая тройная трансгенная модель мышей (3xTgAD), экспрессирующих гены APP_{Sw} (со шведской мутацией, приводящей к развитию ускоренной формы БА), PS1 (M146V) и тау-белка (P301L) (Oddo et al., 2003), которая до сих пор является наиболее часто используемой в исследованиях патологии БА (Cavanaugh et al., 2014). Помимо основных признаков БА (ускоренное образование Аβ, наличие сенильных бляшек и нейрофибриллярных клубков) эти мыши демонстрируют другие патологические и поведенческие особенности, характерные для БА, а именно – глиоз, синаптические нарушения и ухудшение памяти. Помимо трансгенных линий мышей были также получены аналогичные линии трансгенных крыс, однако немногие из них характеризуются накоплением Аβ и/или нейрофибриллярных клубков (Cavanaugh et al., 2014). Недавно были получены трансгенные крысы (TgF344-AD), которые экспрессируют гены человеческого APP со шведской мутацией и PS1 (PS1ΔE9), приводя к развитию бляшек и к накоплению гиперфосфорилированного тау-белка, корый является предшественником нейрофибриллярных клубков (Cohen et al., 2013).

Для выяснения роли возрастного фактора в развитии спорадической формы БА была получена линия мышей с ускоренным старением. У этих животных к 6-месячному возрасту наблюдаются отложения Аβ и когнитивные нарушения (DelValle et al., 2010).

Основным недостатком существующих моделей является их ограниченная применимость в исследованиях молекулярно-клеточных механизмов, действующих на ранней стадии патологии, когда когнитивный дефицит еще не сопровождается накоплением амилоидных бляшек и массовой гибелью нервных клеток и, скорее всего, связан с нарушением регуляции межнейронного взаимодействия (Arendt, 2003). Более того, они моделируют, в основном, генетически обусловленные формы БА, в то время как большинство случаев этого заболевания имеет спорадическую форму. Также следует отметить, что к настоящему времени ни одна из стратегий лечения БА, основанная на амилоидной гипотезе развития этого заболевания, не прошла клинических испытаний и не может быть признана эффективной из-за недостатка исследований нормальной физиологической роли APP и образующегося из него

продукта Аβ (Hardy, 2009; Nalivaeva, Turner, 2013; Cavanaugh et al., 2014). Исследование механизмов когнитивного дефицита на ранних стадиях заболевания крайне важно как с точки зрения ранней диагностики, так и в плане разработки стратегий профилактики и терапии. В настоящее время большой интерес вызывает поиск и разработка адекватных зоотропных моделей молекулярно-клеточных механизмов мягкого когнитивного снижения (МКС английская принятая аббревиатура – MCI, ранняя стадия БА), основанных на создании экспериментально вызванной синаптопатии (Arendt, 2003; Pepeu, 2004). В свете этого представляется актуальной попытка разработки подобной модели на основе естественных механизмов нарушения межнейронного взаимодействия, аналогичного наблюдаемому при МКС.

2. Когнитивные дисфункции после действия пренатальной гипоксии

Для моделирования патологических нарушений когнитивных функций нами была разработана модель пренатальной гипоксии, в основе которой лежит действие острой гипоксии в период активного формирования мозга в эмбриогенезе животных. Для этого самок крыс на 14-е сутки беременности (Е14) помещали на 3 часа в гипоксическую камеру с пониженным до 7% содержанием кислорода. В результате такого воздействия на материнский организм у потомства было выявлено отставание в развитии организма, структуры нервной ткани и врожденных двигательных реакций, которое постепенно нивелировалось в процессе взросления (Журавин и др., 2005, 2007б; Дубровская, Журавин, 2008). Однако нарушение когнитивных функций у крыс, подвергавшихся действию пренатальной гипоксии, наблюдалось в разных поведенческих задачах на протяжении всей последующей жизни.

Так, у животных, перенесших гипоксию, снижалась способность к обучению новым инструментальным движениям. В группе крыс, перенесших пренатальную гипоксию, количество молодых животных (20–30 сут после рождения, Р20-Р30), способных обучаться инструментальным навыкам (просто нажимать на поршень), составляло 50%, а в группе взрослых (трехмесячные крысы, давление на поршень более заданного времени) – 46%, в то время как в норме количество животных, способных к обучению этим навыкам, составляло 70 и 73%, соответственно.

При исследовании долговременной памяти и сохранности выработанного инструментального рефлекса через длительный промежуток времени (перерыв после начального обучения в течение 5 недель, после чего повторяли процесс тестирования и обучения инструментальному рефлексу) было обнаружено, что животные контрольной группы сохраняли навык выполнения инструментальных движений с длительным давлением на поршень. У этих животных среднее время давления до и после 5-недельного перерыва не отличалось и значительно ($p<0,001$) превышало среднее время давления, регистрируемое перед началом обучения, в то время как у животных, перенесших пренатальную гипоксию, после перерыва наблюдалось снижение среднего времени давления до начального уровня, регистрируемого перед началом обучения. Дальнейшее обучение животных, перенесших пренатальное гипоксическое воздействие, после пе-

рерыва начиналось как бы заново, в то время как в контрольной группе повторное обучение начиналось от уровня, достигнутого в результате первичного обучения.

При исследовании формирования кратковременной памяти в радиальном двухуровневом лабиринте у взрослых крыс, перенесших пренатальную гипоксию, было обнаружено, что на фоне отсутствия изменений среднего времени нахождения крысы внутри рукава процент правильных посещений кормушек по сравнению с контролем достоверно ($p<0,01$) снижался, что может свидетельствовать о нарушении процессов кратковременной памяти. Исследование памяти в тесте распознавания новых объектов у молодых и взрослых животных также свидетельствовало о нарушении кратковременной (в течение 10 минут) и долговременной (в течение 60 минут или 24 часов) памяти у крыс, перенесших пренатальную гипоксию.

Данная модель позволяет получать хорошо воспроизводимые изменения когнитивных функций (Dubrovskaya et al., 2012) и изучать динамику и молекулярно-клеточные основы этих нарушений в ходе развития животных, а также использовать их для тестирования различных фармакологических препаратов (Журавин и др., 2011; Nalivaeva et al., 2012a,b).

3. Механизмы действия пренатальной гипоксии на развитие кортикальных отделов головного мозга

Известно, что воздействие различных патологических факторов в определенные периоды пренатального развития может приводить к нарушению структурно-функциональной организации мозга в дальнейшем онтогенезе, сопровождающемуся рядом моторных и когнитивных дисфункций. Существование периодов повышенной чувствительности мозга к повреждающим факторам базируется на гетерохронности онтогенетического развития нервной системы (Rice, Baron, 2000). Показано, что неблагоприятные воздействия в такие критические периоды эмбрионального развития могут вызывать структурно-функциональные нарушения на всех уровнях организации головного мозга. В частности, на моделях ионизирующего радиационного облучения (Rakic, 1988; Algan, Rakic, 1997), ультразвукового воздействия (Ang et al., 2006) было показано нарушение генерации и радиальной миграции нейробластов в кортикальную пластинку, что вызывает нарушения дальнейшего формирования неокортекса, сопровождающиеся длительными нарушениями регуляции двигательной активности и когнитивных функций. На модели пренатальной гипоксии нами было показано, что причины структурно-функциональных изменений, наблюдавшихся многими авторами (Nyakas et al., 1996; Журавин и др., 2003; Отеллин и др., 2002) в постнатальном онтогенезе животных, могут также быть связаны с нарушениями генерации и миграции нейробластов, вызванными гипоксическим воздействием в критический период пренатального развития (Vasilev et al., 2012). Пренатальная гипоксия на E14 или E18 вызывает те же нарушения пролиферации и радиальной миграции клеток, какие были описаны на различных негипоксических моделях пренатальной патологии в те же периоды эмбрионального развития мозга (Ang et al., 2006). Согласно литературным данным,

гипоксия на Е17 может нарушать миграцию нейробластов в гиппокампе (Golan et al., 2009), однако влияние такого нарушения миграции клеток на формирование нейронных сетей в дальнейшем онтогенезе животных еще не изучено.

4. Изменения структурно-функциональной организации нервной ткани в постнатальном онтогенезе после пренатальной гипоксии

При помощи электронной микроскопии нами было показано, что в раннем постнатальном онтогенезе крысята, перенесшие пренатальную гипоксию, отстают в формировании синаптических контактов в нейропиле, миелинизации нервных волокон и дифференцировке нейронов на ультраструктурном уровне как в ткани новой коры, так и базальных ганглиев (Журавин и др., 2005, 2007). При этом на Р10-30 происходит снижение общего количества пирамидных нейронов во II–III и V–VI слоях коры головного мозга (Васильев и др., 2008) и нарушается соотношение числа пирамидных и непирамидных нейронов. Снижение числа пирамидных нейронов наблюдалось только в течение первого месяца постнатального онтогенеза (период интенсивной элиминации избыточного клеточного материала, установления межнейронных связей и формирования новых синапсов в кортикальной пластинке), но не у взрослых животных, а также только у крыс, подвергнутых пренатальной гипоксии на Е14, но не на Е18. Следует отметить избирательное действие пренатальной гипоксии на различные клеточные популяции коры головного мозга. Так, на Р10-20 у крыс, перенесших пренатальную гипоксию на Е14, снижается число больших пирамидных нейронов в V–VI слоях новой коры, что связано с обнаруженным нами нарушением миграции нейробластов, из которых образуется данная клеточная популяция. Время проведения гипоксии на Е14 совпадает с периодом генерации первых клеток кортикальной пластинки, которые в будущем дают кортикофугальные эфференты и служат основой для формирования кортикальной миниколонки. Нарушение миграции нейробластов в эмбриогенезе приводит к тому, что значительная часть пирамидных нейронов V–VI слоя коры оказывается за ее пределами и элиминируется на Р10-30 (Vasilev et al., 2012). В период Р20-30 у животных, перенесших гипоксию на Е14, наблюдалось снижение количества малых пирамидных нейронов II–III слоев и непирамидных клеток (интернейронов) на фоне общего снижения плотности расположения клеток новой коры (Васильев и др., 2008). К периоду Р60 в новой коре этих животных происходит нормализация клеточного состава, после завершения элиминации избыточного клеточного материала и временных элементов, таких как субпластинка (Del Rio et al., 2000), и различий в цитоархитектонике и клеточном составе между животными с нормальным и нарушенным эмбриональным развитием уже не наблюдается. Таким образом, пренатальная гипоксия в период образования первых клеточных элементов кортикальной пластинки (Е14) нарушает формирование корковых миниколонок в постнатальном онтогенезе. Гипоксия в более поздний период (Е18) не столь критична для формирования коры головного мозга и не вызывает существен-

ных изменений в ее цитоархитектонике. Аналогичные процессы изменения клеточного состава наблюдались и в дорсальном гиппокампе животных, перенесших пренатальную гипоксию. Однако дорсальный гиппокамп (поле CA1) характеризовался более низкой степенью выраженности нейродегенеративных изменений: снижением количества нейронов пирамидного слоя, увеличением числа нейронов с дегенерацией апикальных дендритов, при этом нарушение соотношения разных типов клеток и их отсроченная гибель наблюдались только на 20-е сутки постнатального развития (Журавин и др., 2009а,б).

5. Роль каспаз в структурно-функциональных изменениях после пренатальной гипоксии

Есть основания полагать, что причины изменения общей плотности расположения клеток и изменения клеточного состава в ткани мозга животных после действия пренатальной гипоксии связаны скорее с усилением элиминации избыточного клеточного материала, вызванного нарушением миграции нейробластов в период эмбриогенеза, нежели с гибелью клеток от непосредственного действия гипоксии. Полученные нами данные свидетельствуют о повышении экспрессии и активности каспазы-3, а также об увеличении количества нейронов с повышенной экспрессией проапоптотических белков (P53 и каспаза-3) в кортикальных отделах мозга крыс, перенесших пренатальную гипоксию (Васильев и др., 2008, 2013), что можно интерпретировать в пользу гибели клеток по механизму каспазозависимого апоптоза. Молекулярные механизмы апоптоза весьма сложны и не полностью изучены, однако известно, что каспазозависимый апоптоз характеризуется наличием нескольких вариантов путей определения судьбы клеток и инициации их гибели, при этом общие терминальные этапы связаны с усилительным каскадом активации каспаз, центральными компонентами которого являются каспаза-9 и каспаза-3 (Fan et al., 2005). Активированные каспазы оказывают влияние на многие белки в цитоплазме клетки, включая клеточные протеазы, вызывающие деградацию структурных и регуляторных белков на завершающих стадиях апоптоза (для обзора см. Snigdha et al., 2012). Имеются данные о том, что каспазы-9 и -8 также активируются при гипоксии и ишемии мозга (Delivoria-Papadopoulos et al., 2008; Broughton et al., 2009). Считается, что повышение активности каспаз (прежде всего каспазы-3) в пре- и постсинаптических терминалях приводит к протеолизу многих синапс-ассоциированных белков и нарушению регуляции работы межнейронных контактов, причем мишенями для каспаз могут являться белки цитоскелета, рецепторы и регуляторные белки (Lema Tomé et al., 2006). Нарушение функций межнейронных контактов, в том числе аксо-шипиковых, наблюдаемое при различных патологиях, например при БА, также связывают с активацией каспаз при запуске апоптоза нейронов, вызванного накоплением Aβ (D'Amelio et al., 2011). Такая концепция позволяет рассматривать возможность компенсации патологии, используя различные ингибиторы каспаз. Следует упомянуть, что описано немало случаев повышения содержа-

ния проапоптотических белков и активности каспаз без гибели клеток (Oomman et al., 2004), что подтверждает их неапоптотические функции (D'Amelio et al., 2010; Chowdhury et al., 2008; Jiao, Li, 2011; Heta, Glimcher, 2008). Хотя избыточная активация каспаз в период эмбриогенеза приводит к комплексному нарушению формирования головного мозга (Roth, D'Sa, 2001), экспериментально вызванное снижение активности каспазы-3 у взрослых животных приводит к снижению способности к обучению (Kudryashov et al., 2002). Предполагается, что изменение активности каспазы-3 влияет на синаптическую пластичность, поэтому ее снижение может сопровождаться когнитивными дисфункциями (Gulyaeva, 2003; Kudryashova et al., 2009a,b). Полученные нами предварительные данные показали, что системы регуляции экспрессии активной формы каспазы-3 в раннем постнатальном онтогенезе различаются у животных с нормальным эмбриональным развитием и перенесших пренатальную гипоксию. Было показано, что *i.v.* введение ингибиторов каспазы-3 (Z-DEVD-FMK или Ac-DEVD-CHO) на 18–25-е сутки после рождения изменяет активность этого фермента в кортикальных структурах головного мозга в течение первых трех суток после инъекции. При этом через 1–3 суток после инъекции у животных, перенесших пренатальную гипоксию и характеризующихся повышенным уровнем каспаз, активность каспазы-3 снижается до уровня контрольных животных. Примечательно, что у контрольных животных активность каспазы-3, напротив, увеличивается за счет компенсаторного повышения экспрессии активной формы этого фермента. Через месяц после инъекции ингибиторов экспрессия и активность каспазы-3 возвращается к исходным значениям, присущим каждой из исследованных групп.

6. Синаптическая пластичность как основа адаптивных возможностей нейронных сетей

В литературе имеются убедительные данные о том, что дендритные шипики в значительной степени определяют характер межклеточного взаимодействия и могут рассматриваться в качестве основного субстрата пластичности нервной ткани. Наиболее длительные процессы, вовлеченные в реализацию памяти, связаны с формированием новых межнейронных контактов в сети, осуществляющей реверберации. Новообразованные дендритные шипики могут достаточно быстро образовывать синаптический контакт и становиться активными в течение нескольких часов (Zito et al., 2009), а сами синапсы являются местом более быстрой (секунды–минуты) пластической перестройки, которая, несомненно, оказывает влияние на эффективность передачи сигнала (Martin et al., 2000; Prescott et al., 1999). Скорее всего, образование памятного следа связано как с быстрой модуляцией активности синапса, так и с более медленными процессами структурной реорганизации, необходимой для его длительного хранения (Arendt, 2003). В аксошипиковых синапсах шипиковый аппарат вовлечен в процесс локального синтеза, посттрансляционных изменений и транспорта множества синапс-ассоциированных белков (Segal, 2010).

Одним из маркерных белков шипикового аппарата является актин-ассоциированный белок синаптоподин. Короткая форма синаптоподина локализуется в шипиковом аппарате, связана с α-актинином и участвует в стабилизации актиновых компонентов цитоскелета в шейке шипика (Mundel et al., 1997). Синаптоподин необходим для формирования шипикового аппарата и ремоделирования цитоскелета шипика при изменении его размера и формы (Deller et al., 2003, 2006). У трансгенных мышей, лишенных гена синаптоподина, отмечается ухудшение кратковременной памяти, угнетение долговременной потенциации (LTP) и отсутствие развитого аппарата в дендритных шипиках гиппокампа (Deller et al., 2003). Однако оверэкспрессия синаптоподина не влияет на размер и количество дендритных шипиков, хотя повышение экспрессии этого белка наблюдается при LTP (Okubo-Suzuki et al., 2008). Таким образом, в настоящее время принято считать, что синаптоподин участвует в обеспечении пластичности нейронных сетей за счет реорганизации распределения лабильных аксошипиковых межнейронных контактов (Segal et al., 2010) и в процессах консолидации памятных следов (Asanuma et al., 2005).

Нарушение синаптогенеза и формирования активного шипикового аппарата рассматривают в качестве основных причин, влияющих на пластичность нервной ткани и развитие когнитивного дефицита или нейрональных патологий (Sousa et al., 2000; Shapiro, Ribak, 2005; Chen et al., 2010; Sanchez et al., 2012; Santos, 2004). Однако работы, в которых оценивается соотношение количества лабильных и стабильных аксо-шипиковых контактов в нервной ткани обучаемых и наивных животных на разных стадиях онтогенеза в норме и при нарушении памяти, практически отсутствуют. Благодаря разработанному в нашей лаборатории методу оценки пластичности нервной ткани путем сравнения числа лабильных аксо-шипиковых контактов у животных, подвергнутых разным экспериментальным воздействиям, нам удалось показать, что способность животных к запоминанию (кратковременная и долговременная память) коррелирует с числом синаптоподин-позитивных дендритных шипиков в коре головного мозга (Dubrovskaya et al., 2012). Показано, что пренатальная гипоксия у крыс в период, критический для формирования миниколонок коры мозга (E14), приводит к сокращению количества синаптоподин-позитивных дендритных шипиков в молекулярном слое новой коры и в stratum radiatum-moleculare поля CA1 гиппокампа (Журавин и др., 2009б), которое сопровождается ослаблением рабочей памяти. Мы полагаем, что снижение числа лабильных синаптоподин-позитивных шипиков в stratum radiatum-moleculare поля CA1 гиппокампа крыс, перенесших пренатальную гипоксию, может быть связано со структурными изменениями в энторинальной коре, нарушения в которой являются самыми ранними признаками развития БА (Gómez-Isla et al., 1996).

Согласно нашим данным, сокращение количества синаптоподин-позитивных шипиков на фоне естественного снижения способности к обучению наблюдается и у стареющих животных, что может являться одной из основных причин когнитивных дисфункций при нормальном старении, а также при развитии спорадической формы БА (Журавин и др., 2009б).

7. Нарушение межнейронного взаимодействия

Механизмы нарушения межнейронных взаимодействий, вызванных патологией пренатального развития, скорее всего комплексные и не исчерпываются только изменением пластичности синаптических контактов. В существующей литературе имеются данные, указывающие на то, что пренатальная гипоксия оказывает избирательное действие на различные клеточные популяции и может вызывать нарушения функционирования разных медиаторных систем в постнатальном онтогенезе (Nyakas et al.,1996; Louzoun-Kaplan et al., 2008; Gerstein et al., 2005). Используя везикулярный переносчик ацетилхолина (VAChT) в качестве маркерного белка, мы проанализировали влияние пренатальной гипоксии на распределение холинергических пресинаптических терминалей в коре головного мозга крыс. Установлено, что у взрослых крыс, перенесших гипоксию на Е14, снижается количество VAChT-позитивных холинергических пресинаптических терминалей, образующих аксо-соматические синапсы на телах пирамидных нейронов V–VI слоев теменной коры (Васильев и др., 2013), что свидетельствует об изменении холинергической модуляции функционирования кортикальных миниколонок в коре мозга таких животных. Методом иммуноблотинга также было проведено сравнение содержания белка синаптофизина, локализованного в пресинаптических терминалях независимо от вырабатываемого в них медиатора, и белка – переносчика возбуждающих аминокислот (ЕААТ), являющегося маркером активных глутаматергических терминалей в коре мозга. У крыс, перенесших пренатальную гипоксию, содержание синаптофизина не отличалось от контроля, однако содержание ЕААТ было выше, чем у крыс с нормальным развитием (Васильев и др., 2013), что свидетельствует о повышении интенсивности выброса глутамата в синаптическую щель у гипоксических животных. Это может провоцировать спонтанную эпилептиформную активность и повышать судорожную готовность животных с патологией развития в ответ на фармакологические воздействия и другие внешние стимулы. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о комплексных нарушениях межнейронного взаимодействия на взрослой стадии у животных с патологией эмбрионального развития.

8. Изменения на молекулярном и биохимическом уровнях

Помимо функциональных и структурных изменений, вызванных пренатальной гипоксией, в нервной ткани экспериментальных животных наблюдались существенные перестройки на молекулярном и биохимическом уровнях. Это выражалось, прежде всего, в изменении экспрессии разных генов на уровне мРНК и белка, а также активности ряда ферментов (в частности, упомянутых выше каспаз) и систем трансдукции сигналов, в том числе холинергической медиации. Так, в постнатальном онтогенезе животных, перенесших пренатальную гипоксию, наблюдалась существенно иная динамика активности ацетил- и бутирилхолинэстераз (АХЭ и БХЭ) в сенсомоторной коре (Лавренова и др., 2003; Кочкина и др., 2015). Это про-

являлось не только в снижении активности данных ферментов на определенных этапах развития мозга (в частности, в первый месяц постнатального развития и активного формирования межклеточных контактов), но также в изменении соотношения мембраносвязанной, выполняющей медиаторные функции, и растворимой формы АХЭ (Лавренова и др., 2003; Кочкина и др., 2015), выполняющей роль фактора роста нервов и участвующей в синаптогенезе (Halliday, Greenfield, 2012). Более того, пренатальная гипоксия с возрастом приводила к повышению доли БХЭ в общей холинэстеразной акткивости, что может иметь компенсаторный характер, поскольку этот фермент играет важную роль в выведении из ткани мозга токсических агентов, которые могут образовываться в результате перенесенной гипоксии и нарушения нормального функционирования мозга. С другой стороны, повышение активности БХЭ в ткани мозга является одним из характерных признаков БА и может свидетельствовать о наличии нарушений, предрасполагающих к развитию нейродегенерации (Greig et al., 2002).

Анализ содержания предшественника амилоидного пептида (APP) в сенсомоторной коре также выявил существенное изменение динамики экспрессии этого белка в постнатальном онтогенезе крыс, перенесших пренатальную гипоксию (Nalivaeva et al., 2003, 2005), в то время как гипоксия приводила к повышению содержания мембраносвязанной формы APP на всех анализируемых этапах развития, образование его растворимой формы (sAPP), обладающей нейритогенными свойствами, было снижено. При этом наиболее существенное снижение наблюдалось в период интенсивного синаптогенеза (P10-P30), когда недостаток данного нейритогенного фактора может привести к нарушению формирования нейрональных систем мозга. Полученные данные также свидетельствуют, что пренатальная гипоксия существенным образом модифицирует активность α-секретазы – фермента, играющего важную роль в образовании основного пула sAPP в нервной ткани и препятствующего формированию Aβ. Недостатком активности этого фермента можно объяснить снижение образования растворимой формы АХЭ (Nalivaeva, Turner, 1999). В целом, повышение уровня содержания APP и снижение его неамилоидного расщепления под действием α-секретазы, вызванные пренатальной гипоксией, могут являться предпосылкой к сдвигу амилоидного метаболизма в сторону процессов, инициирующих развитие БА.

Важным фактором, который обуславливает накопление Aβ в ткани мозга при развитии спорадической формы БА, является дефицит активности амилоид-деградирующих ферментов и нарушение выведения избытков этого пептида из нервной ткани (для обзора см. Nalivaeva et al., 1992, 2012a). Согласно нашим данным, пренатальная гипоксия приводит к снижению уровня экспрессии и активности основного амилоид-деградирующего фермента неприлизина (НЕП) и его гомолога эндотелин-конвертирующего фермента (ЭКФ, ECE-1) (Nalivaeva et al., 2003), что может способствовать накоплению Aβ и развитию патологии, в частности, нарушению памяти. Подтверждением этому служат результаты наших экспериментов по введению ингибитора НЕП и ЭКФ фосфорамидона в кору мозга интактных взрослых крыс. Длительное *i.c*. введение фосфорамидона ($2 \cdot 10^{-3}$ М, со скоростью 0,25 мкл в час в течение 28 суток посредством миниосмотических помп – Alzet, USA) вызыва-

ло у взрослых крыс нарушение кратковременной памяти в радиальном лабиринте и снижение среднего количества синаптоподин-позитивных шипиков в молекулярном слое коры мозга. Эти результаты согласуются с данными, полученными ранее в экспериментах с многократными (6–8 раз с интервалом в 1 сутки) одиночными *i.c*. введениями ингибиторов НЕП фосфорамидона или тиорфана (Дубровская и др., 2009).

У животных, перенесших пренатальную гипоксию, снижение активности НЕП наблюдается не только в коре, но и в гиппокампе (Nalivaeva et al., 2012b). Однако в плазме крови этих животных мы наблюдали повышение активности НЕП по сравнению с контролем. Такое разнонаправленное изменение активности НЕП в ткани мозга и плазме крови может свидетельствовать о различиях в системе регуляции НЕП, экспрессируемого в центральной нервной системе и вне ее. Более того, повышение экспрессии НЕП в плазме может быть отражением компенсаторных изменений, направленных на снижение Аβ в нервной ткани посредством поддержания баланса, существующего между пулами Аβ в ткани мозга и крови (Guan et al., 2009).

Анализ экспрессии еще одной амилоид-деградирующей протеазы – инсулин-деградирующего фермента (ИДФ), в структурах мозга крыс после пренатальной гипоксии также показал снижение его содержания в разных структурах мозга. Так, на разных этапах постнатального онтогенеза, начиная с P30 и заканчивая старыми животными (P600), уровень содержания этого фермента в коре был на 40–50%, а в стриатуме на 30% ниже, чем в контроле. В гиппокампе наиболее существенное снижение ИДФ (на 60%) наблюдалось на P20. Поскольку ИДФ играет важную роль в метаболизме инсулина, дефицит его активности после пренатальной гипоксии может приводить не только к развитию патологий, обусловленных накоплением Аβ, но и к диабету.

В поисках средств повышения активности амилоид-деградирующих ферментов, в частности НЕП, уровень которого также существенно снижается с возрастом, были проведены интенсивные исследования с использованием клеточных моделей, которые существенно расширили наши представления о механизмах регуляции экспрессии гена этого фермента (Belyaev et al., 2009, 2010). Так, было убедительно показано, что экспрессия НЕП регулируется по принципу обратной связи цитоплазматическим фрагментом APP (AICD), который образуется одновременно с Аβ в результате действия на молекулу APP β- и γ-секретаз (Pardossi-Piquard et al., 2005; Belyaev et al., 2009). С другой стороны, было установлено, что репрессия гена НЕП в нервных клетках осуществляется с помощью гистондеацетилаз, и их ингибирование (трихостатином А или вальпроатом натрия) приводит к повышению уровня экспрессии и активности НЕП (Belyaev et al., 2009). Другим классом соединений, способных повышать экспрессию и активность НЕП, являются антиоксиданты зеленого чая, в частности эпигаллокатехингаллат (EGCG), положительный эффект которых был показан при разных нейродегенеративных заболеваниях (Melzig, Janka, 2003; Weinreb et al., 2004). В серии экспериментов на животных, подвергавшихся пренатальной гипоксии, нами было показано, что *i.p.* инъекции вальпроата натрия (200 мкг/кг веса, 2 недели) или *i.c.* введение EGCG ($2 \cdot 10^{-3}$ M,

посредством миниосмотических помп в течение 28 дней) существенно поышали уровень экспрессии и активности НЕП в коре и гиппокампе, приближая его к контрольным величинам. Повышение активности НЕП у этих животных коррелировало с числом правильных пробежек в радиальном лабиринте и восстановлением кратковременной и долговременной памяти в тесте распознавания новых объектов, а также с повышением количества лабильных шипиков в коре мозга (после введения вальпроата натрия) и в гиппокампе (после введения EGCG) по сравнению с животными, перенесшими пренатальную гипоксию и получавшими физраствор вместо тестируемых соединений (Журавин и др., 2011; Nalivaeva et al., 2012a).

В исследованиях по влиянию гипоксии на уровень экспрессии НЕП с использованием клеток нейробластомы человека NB7 показано, что снижение содержания мРНК и ферментативной активности НЕП при гипоксии сопровождается пониженным связыванием транскриационного фактора AICD с промотером его гена. Поскольку AICD является субстратом каспаз, которые активируются при гипоксии, нами был проведен анализ действия ингибитора каспаз Z-DEVD-FMK на уровнь НЕП и показано, что его добавление к клеткам до начала гипоксического воздействия восстанавливало связывание AICD с промотором НЕП и повышало уровень активности НЕП (Beckett et al., 2012). Эти исследования показывают наличие связи между изменением эпигенетической регуляции нейрональных генов, уровнем нейрональной пластичности и активацией каспаз, поскольку последние могут не только регулировать содержание транскрипционных факторов, включая AICD, но также и белков цитоскелета и синаптического аппарата (Itoh et al., 2011; Sultana et al., 2010). Дальнейшие исследования с применением модели пренатальной гипоксии, несомненно, углубят наши представления о механизмах регуляции когнитивных функций на молекулярном уровне, которые могут лечь в основу создания средств профилактики когнитивных нарушений.

9. Заключение

Несмотря на различия в механизмах генеза отставленного когнитивного дефицита, наблюдаемого после пренатальной патологии, и при развитии такого нейродегенеративного заболевания, как болезнь Альцгеймера, обе эти патологии имеют общие особенности. Как при пренатальной гипоксии, так и на ранних стадиях МКС происходит дисрегуляция синапс-ассоциированных белков, сопровождающаяся комплексными нарушениями межнейронного взаимодействия, в первую очередь снижением пластичности и адаптивного потенциала кортикальных отделов головного мозга. Это провоцирует у таких животных когнитивные дисфункции на взрослой стадии развития. Повышение активности каспаз в раннем постнатальном онтогенезе животных, перенесших пренатальную гипоксию, может вызывать деградацию синапс-ассоциированных белков и дегенерацию синаптических структур, вызывая когнитивный дефицит на взрослой стадии развития. Изменение уровня активности ферментов, участвующих в образовании и катаболизме Аβ, являющегося основным токсическим агентом, приводящим к БА, также создает предпосыл-

Таблица

Анализ характеристики поведения, структурно-функциональных и биохимических изменений в структурах мозга экспериментальных животных

Вид воздействия	Память			Количество синаптоподин-позитивных шипиков		Активность неприлизина	
	кратко-временная		долго-временная				
	Радиальный лабиринт	Распознавание новых объектов (10 мин.)	Распознавание новых объектов (60 мин. или 24 часа)	Теменная кора	Гиппокамп	Теменная кора	Гиппокамп
Пренатальная гипоксия	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
i.c. фосфорамидон (взрослые контрольные крысы)	↓	↓	↓	↓	–	↓	↓
i.p. вальпроат натрия (взрослые крысы, перенесшие пренатальную гипоксию)	↑	↑	↑	↑	–	↑	↑
i.c. эпигалло-катехингаллат (взрослые крысы, перенесшие пренатальную гипоксию)	↑	↑	↑	–	↑	↑	↑
i.c. ингибиторы каспазы-3 (3-недельные крысята, перенесшие пренатальную гипоксию)	↑	↑	↑	↑	?	?	?

↑ – улучшение или увеличение по сравнению с животными, перенесшими пренатальную гипоксию, ↓ – ухудшение или уменьшение по сравнению с контролем, — – нет статистически достоверных изменений, ? – нет данных.

ки к его накоплению в процессе старения мозга. Эти же изменения наблюдаются после пренатальной гипоксии на более ранних стадиях развития. Накопленные к настоящему времени результаты исследований, проводимых в нашей лаборатории (табл.), и данные литературы подтверждают, что модель пренатальной гипоксии является адекватным инструментом для изучения молекулярных механизмов ранних

этапов развития когнитивных дисфункций и удобным объектом для разработки и тестирования лекарственных препаратов.

Литература

Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Журавин И.А. Изменение нервной ткани новой коры в онтогенезе крыс после гипоксии на разных сроках онтогенеза // Журнал эволюц. биохим. физиол. 2008. Т. 44. № 3. С. 258-266.

Васильев Д.С., Туманова Н.Л., Журавин И.А. Изменение межклеточного взаимодействия в кортикальных отделах мозга крыс после пренатальной гипоксии // Материалы XXII Съезда Физиологического общества им. И.П. Павлова, г. Волгоград, 16-20 сентября. 2013. С. 531-532.

Дубровская Н.М., Журавин И.А. Онтогенетические особенности поведения крыс, перенесших гипоксию на 14-е или 18-е сутки эмбриогенеза // ЖВНД. 2008. Т. 58. № 5. С. 616-625.

Дубровская Н.М., Наливаева Н.Н., Плеснева С.А. и др. Изменение активности амилоид-деградирующих металлопептидаз приводит к нарушению памяти у крыс // ЖВНД. 2009. Т. 59. № 5. С. 630-638.

Журавин И.А., Дубровская Н.М., Туманова Н.Л. Постнатальное физиологическое развитие крыс после острой пренатальной гипоксии // Российский физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2003. Т. 89. № 5. С. 522-532.

Журавин И.А., Туманова Н.Л., Озирская Е.В. и др. Формирование структурной и ультраструктурной организации стриатума в раннем постнатальном онтогенезе крыс при изменении условий их эмбрионального развития // Морфология. 2005. Т. 127. № 2. С. 31-36.

Журавин И.А., Туманова Н.Л., Озирская Е.В. и др. Формирование структурной и ультраструктурной организации стриатума в постнатальном онтогенезе крыс при изменении условий их эмбрионального развития // Журнал эвол. биох. физиол. 2007а. Т. 43. № 2. С. 199-208.

Журавин И.А., Дубровская Н.М., Кочкина Е.Г. и др. Исследование действия гипоксии на развитие функций мозга и метаболизм амилоидного пептида с целью разработки средств ранней диагностики и профилактики болезни Альцгеймера // Технол. жив. сист. 2007б. Т. 4. № 5-6. С. 109-122.

Журавин И.А., Туманова Н.Л., Васильев Д.С. Структурные изменения нервной ткани гиппокампа в онтогенезе крыс после пренатальной гипоксии // Журнал эвол. биох. физиол. 2009а. Т. 45. № 1. С. 138-140.

Журавин И.А., Туманова Н.Л., Васильев Д.С. Изменение адаптивных механизмов мозга в онтогенезе крыс, перенесших пренатальную гипоксию // Докл. РАН. 2009б. Т. 425. № 1. С. 123-125.

Журавин И.А., Дубровская Н.М., Васильев Д.С. и др. Эпигенетическая и фармакологическая регуляция амилоид-деградирующего фермента неприлизина приводит к изменению когнитивных функций млекопитающих // Докл. РАН. 2011. Т. 438. № 6. С. 838-841.

Захаров В.В., Яхно Н.Н. Когнитивные расстройства в пожилом и старческом возрасте. Методическое пособие для врачей. М., 2005.

Кочкина Е.Г., Плеснева С.А., Журавин И.А. и др. Влияние гипоксии на активность холинэстераз в сенсомоторной коре мозга крыс // Журнал эвол. биох. физиол. 2015. Т. 51. № 1. В печати.

Лавренова С.М., Наливаева Н.Н., Журавин И.А. Активность ацетилхолинэстеразы сенсомоторной коры в раннем онтогенезе крыс, перенесших пренатальную гипоксию // Журнал эвол. биох. физиол. 2003. Т. 39. С. 154-159.

Отеллин В.А., Хожай Л.И., Гилерович Е.Г. и др. Повреждающие воздействия в критическиепериодыпренатального онтогенеза как фактор, модифицирующийструктурноеразвитие головного мозга и поведенческие реакции после рождения // Вестник РАМН. 2002. Т. 12. С. 32-35.

Algan O., Rakic P. Radiation-induced, lamina-specific deletion of neurons in the primate visual cortex // J. Comp. Neurol. 1997. Vol. 381. P. 1096-9861.

Ang E.S. Jr., Gluncic V., Duque A. et al. Prenatal exposure to ultrasound waves impacts neuronal migration in mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. Vol. 103. P. 12903-12910.

Arendt T. Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity // Prog. Neurobiol. 2003. Vol. 71. P. 83-248.

Asanuma K., Kim K., Oh J. et al. Synaptopodin regulates the actin-bundling activity of α-actinin in an isoform-specific manner // J. Clin. Invest. 2005. Vol. 115. P. 1188-1198.

Beckett C., *Bagrova D.I., Belyaev N.D., Turner A.J., Nalivaeva N.N.* Caspase cleavage of the amyloid precursor protein intracellular domain (AICD) decreases neprilysin expression and increases Aβ in hypoxia // J. Neurochem. 2012. Vol. 123. P. 101.

Belayev N.D., *Nalivaeva N.N., Makova N.Z. et al.* Neprilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease // EMBO Rep. 2009. Vol. 10. P. 94-100.

Belyaev N.D., *Kellett K.A., Beckett C. et al.* The transcriptionally active amyloid precursor protein (APP) intracellular domain is preferentially produced from the 695 isoform of APP in a β-secretase-dependent pathway // J. Biol. Chem. 2010. Vol. 285. P. 41443-41454.

Broughton B.R., *Reutens D.C., Sobey C.G.* Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia // Stroke. 2009. Vol. 40. P. 331-339.

Cavanaugh S.E., *Pippin J.J., Barnard N.D.* Animal models of Alzheimer disease: historical pitfalls and a path forward // ALTEX. 2014. doi:http://dx.doi.org/10.14573/altex.1310071.

Chen Y., *Rex C.S., Rice C.J. et al.* Correlated memory defects and hippocampal dendritic spine loss after acute stress involve corticotropin-releasing hormone signaling // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. Vol. 107. P. 13123-13128.

Cheng I.H., Scearce-Levie K., Legleiter J. et al. Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models // J. Biol. Chem. 2007. Vol. 282. P. 23818-23828.

Chowdhury I.,Tharakan B., Bhat G.K. Caspases – an update // Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol. 2008. Vol. 151. P. 10-27.

Cohen R.M., *Rezai-Zadeh K., Weitz T.M. et al.* A transgenic Alzheimer rat with plaques, tau pathology, behavioral impairment, oligomericabeta, and Frank neuronal loss // J. Neurosci. 2013. Vol. 33. P. 6245-6256.

D'Amelio M., *Cavallucci V., Cecconi F.* Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death // Cell. Death. Differ. 2010. Vol. 17. P. 1104-1114.

D'Amelio M., *Cavallucci V., Middei S.et al.* Caspase-3 triggers early synaptic dysfunction in a mouse model of Alzheimer's disease // Nat. Neurosci. 2011. Vol. 14. P. 69-76.

De la Monte S.M., Wands J.R. Review of insulin and insulin-like growth factor expression, signaling, and malfunction in the central nervous system: relevance to Alzheimer's disease // J. Alzheimers Dis. 2005. Vol. 7. P. 45-61.

Delivoria-Papadopoulos M., *Ashraf Q.M., Ara J. et al.* Nuclear mechanisms of hypoxic cerebral injury in the newborn: the role of caspases // Semin. Perinatol. 2008. Vol. 32. P. 334-43.

Deller T., Korte M., Chabanis S. et al. Synaptopodin-deficient mice lack a spine apparatus and show deficits in synaptic plasticity // PNAS. 2003. Vol. 100. P. 10494-10499.

Deller T., Bas Orth C., Vlachos A. et al. Plasticity of synaptopodin and the spine apparatus organelle in the rat fascia dentata following entorhinal cortex lesion // J. Compar. Neurol. 2006. Vol. 499. P. 471-484.

Del Rio J.A., Martinez A., Auladell C. et al. Developmental history of the subplate and developing white matter in the murine neocortex. Neuronal organization and relationship with the main afferent systems at embryonic and perinatal stages // Cerebral Cortex. 2000. Vol. 10. P. 784-801.

Del Valle J., Duran-Vilaregut J., Manich G. et al. Early amyloid accumulation in the hippocampus of SAMP8 mice // J. Alzheimers Dis. 2010. Vol. 19. P. 1303-1315.

Dubrovskaya N.M., Nalivaeva N.N., Vasilev et al. Mechanisms of short-term working memory deficit // Short-Term Memory: New Research. Eds. G. Kalivas, S.F. Petralia. NY: Nova Science Publishers Inc., 2012. Ch. 6. P. 155-173.

Dumas J.A., Newhouse P.A. The cholinergic hypothesis of cognitive aging revisited again: cholinergic functional compensation // Pharmacol. Biochem. Behav. 2011. Vol. 99. P. 254-261.

Fan T.J., *Han L.H., Cong R.S. et al.* Caspase family proteases and apoptosis // Acta. Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). 2005. Vol. 37. P. 719-727.

Flood J.F., *Cherkin A.* Scopolamine effects on memory retention in mice: a model of dementia? // Behav. Neural. Biol. 1986.Vol. 45. P. 169-184.
Gerstein M., *Huleihel M., Mane R. et al.* Remodeling of hippocampal GABAergic system in adult offspring after maternal hypoxia and magnesium sulfate load: immunohistochemical study // Exp. Neurol. 2005. Vol. 196. P. 18-29.
Golan M.H., *Mane R., Molczadzki G. et al.* Impaired migration signaling in the hippocampus following prenatal hypoxia // Neuropharmacology. 2009. Vol. 57. P. 511-522.
Gómez-Isla T., *Price J.L., McKeel D.W. Jr. et al.* Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease // J. Neurosci. 1996. Vol. 16. P. 4491-4500.
Greig N.H., Lahiri D.K., Sambamurti K. Butyrylcholinesterase: an important new target in Alzheimer's disease therapy // Int. Psychogeriatr. 2002. Vol. 14. Suppl. 1. P. 77-91.
Grunblatt E., *Hoyer S., Riederer P.* Gene expression profile in streptozotocin rat model for sporadic Alzheimer's disease // J. Neural. Transm. 2004. Vol. 111. P. 367-386.
Guan H., *Liu Y., Daily A. et al.* Peripherally expressed neprilysin reduces brain amyloid burden: a novel approach for treating Alzheimer's disease // J. Neurosci. Res. 2009. Vol. 87. P. 1462-1473.
Gulyaeva N.V. Non-apoptotic functions of caspase-3 in nervous tissue // Biochemistry (Mosc). 2003. Vol. 68. P. 1171-1180.
Halliday A.C., Greenfield S.A. From protein to peptides: a spectrum of non-hydrolytic functions of acetylcholinesterase // Protein Pept. Lett. 2012. Vol. 19. P. 165-72.
Hardy J. The amyloid hypothesis for Alzheimer's disease: a critical reappraisal // J. Neurochem. 2009. Vol. 110. P. 1129-1134.
Hardy J., Selkoe D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics // Science. 2002. Vol. 297. P. 353-356.
Hetz C., *Glimcher L.* The daily job of night killers: alternative roles of the BCL-2 family in organelle physiology // Trends Cell. Biol. 2008. Vol. 18. P. 38-44.
Hwang, D.Y., *Cho, J.S., Oh, J.H. et al.* Early changes in behavior deficits, amyloid beta-42 deposits and MAPK activation in doubly transgenic mice co-expressing NSE-controlled human mutant PS2 and APPsw // Cell. Mol. Neurobiol. 2005. Vol. 25. P. 881-898.
Itoh M., *Li S., Ohta K. et al.* Cayman ataxia-related protein is a presynapse-specific caspase-3 substrate // Neurochem. Res. 2011.Vol. 36. P. 1304-1313.
Jiao S., *Li Z.* Nonapoptotic function of BAD and BAX in long-term depression of synaptic transmission // Neuron. 2011. Vol. 70. P. 758-772.
Kudryashov I.E., *Yakovlev A.A., Kudryashova I. et al.* Footshock stress alters early postnatal development of electrophysiological responses and caspase-3 activity in rat hippocampus // Neurosci. Lett. 2002. Vol. 332. P. 95-98.
Kudryashova I.V., *Stepanichev M.Y., Gulyaeva N.V.* Natural activation of caspase-3 is required for the development of operant behavior in postnatal ontogenesis // Neurosci. Behav. Physiol. 2009a. Vol. 39. P. 65-72.
Kudryashova I.V., *Onufriev M.V., Kudryashov I.E. et al.* Caspase-3 activity in hippocampal slices reflects changes in synaptic plasticity // Neurosci. Behav. Physiol. 2009b. Vol. 39. P. 13-20.
Lema Tomé C.M., *Nottingham C.U., Smith C.M. et al.* Neonatal exposure to MK801 induces structural reorganization of the central nervous system // Neuroreport. 2006. Vol. 17. P. 779-783.
Lesne S., Koh M.T., Kotilinek L. et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory // Nature. 2006. Vol. 440. P. 352-357.
Louzoun-Kaplan V., *Zuckerman M., Perez-Polo J.R. et al.* Prenatal hypoxia down regulates the GABA pathway in newborn mice cerebral cortex; partial protection by $MgSO_4$ // Int. J. Dev. Neurosci. 2008. Vol. 26. P. 77-85.
Martin K.C., Barad M., Kandel E.R. Local protein synthesis and its role in synapse-specific plasticity // Currr. Opin. Neurobiol. 2000. Vol. 10. P. 587-592.
McDonald M.P., Overmier J.B. Present imperfect: a critical review of animal models of the mnemonic impairments in Alzheimer's disease // Neurosci. Biobehav. Rev. 1998. Vol. 22. P. 99-120.
Melzig M.F., *Janka M.* Enhancement of neutral endopeptidase activity in SK-N-SH cells by green tea extract // Phytomedicine. 2003. Vol. 10. P. 494-498.

Morrissette D.A., Parachikova A., Green K.N. et al. Relevance of transgenic mouse models to human Alzheimer disease // J. Biol. Chem. 2009. Vol. 284. P. 6033-6037.
Mundel P., *Heid H.W., Mundel T.M. et al.* Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes // J. Cell. Biol. 1997. Vol. 139. P. 193–204.
Nalivaeva N.N., *Turner A.J.* Does acetylcholinesterase secretion involve an ADAMs-like metallosecretase? // Lett. Pept. Sci. 1999. Vol. 6. P. 343-348.
Nalivaeva N.N., *Turner A.J.* The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease // FEBS Lett. 2013. Vol. 587. P. 2046-2054.
Nalivaeva N.N., *Beckett C., Belyaev N.D., Turner A.J.* Are amyloid-degrading enzymes viable therapeutic targets in Alzheimer's disease? // J. Neurochem. 1992. Vol. 120. Suppl. 1. P. 167-185.
Nalivaeva N.N., *Fisk L. Canet Aviles, R.M. et al.* Effects of prenatal hypoxia on expression of amyloid precursor protein and metallopeptidases in the rat brain // Lett. Pept. Sci. 2003. Vol. 10. P. 455-462.
Nalivaeva N.N., *Fisk L., Kochkina E.G. et al.* Effect of hypoxia/ischemia and hypoxic preconditioning/reperfusion on expression of some amyloid-degrading enzymes // Ann. NY Acad. Sci. 2005. Vol. 1035. P. 21-33.
Nalivaeva N.N., *Belyaev N.D., Lewis D.I. et al.* Effect of sodium valproate administration on brain neprilysin expression and memory in rats // J. Mol. Neurosci. 2012a. Vol. 46. P. 569-577.
Nalivaeva N.N., *Belyaev N.D., Lewis D.I. et al.* Effect of sodium valproate administration on brain neprilysin expression and memory in rats // J. Mol. Neurosci. 2012b. Vol. 46. P. 569-577.
Newman T., *Sinadinos C., Johnston A. et al.* Using *Drosophila* models of neurodegenerative diseases for drug discovery // Expert Opin. Drug. Discov. 2011. Vol. 6. P. 129-140.
Nyakas C., *Buwalda B., Luiten P.G.M.* Hypoxia and brain development // Prog. in Neurobiol. 1996. Vol. 49. P. 1-51.
Oddo S., Caccamo A., Shepherd J.D. et al. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction // Neuron. 2003. Vol. 39. P. 409-421.
Okubo-Suzuki R., Okada D., Sekiguchi M. et al. Synaptopodin maintains the neural activity-dependent enlargement of dendritic spines in hippocampal neurons // J. Mol. Cell. Neurosci. 2008. Vol. 38. P. 266-276.
Oomman S., *Finckbone V., Dertien J. et al.* Active caspase-3 expression during postnatal development of rat cerebellum is not systematically or consistently associated with apoptosis // J. Comp. Neurol. 2004. Vol. 476. P. 154-73.
Pardossi-Piquard R., *Petit A., Kawarai T.* Presenilin-dependent transcriptional control of the Aβ-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of βAPP and APLP // Neuron. 2005. Vol. 46. P. 541-554.
Pepeu G. Mild cognitive impairment: animal models // Dialogues Clin. Neurosci. 2004. Vol. 6. P. 369-377.
Pepeu G., *Casamenti F., Pedata F. et al.* Are the neurochemical and behavioral changes induced by lesions of the nucleus basalis in the rat a model of Alzheimer's disease? // Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry. 1986. Vol. 10. P. 541-551.
Prescott S.A., Chase R. Sites of plasticity in the neural circuit mediating tentacle withdrawal in the snail Helix aspersa: implications for behavioral change and learning kinetics // Learn. Mem. 1999. Vol. 6. P. 363-380.
Prickaerts J., Fahrig T., Blokland A. Cognitive performance and biochemical markers in septum, hippocampus and striatum of rats after an i.c.v. injection of streptozotocin: a correlation analysis // Behav. Brain Res. 1999. Vol. 102. P. 73-88.
Rakic P. Defects of neuronal migration and pathogenesis of cortical malformations // Prog. Brain.Res. 1988. Vol. 73. P. 15-37.
Rice D., Baron S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models // Environ. Health Perspect. 2000. Vol. 108. P. 511-533.
Roth K.A., *D'Sa C.* Apoptosis and brain development // Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev. 2001.Vol. 7. P. 261-266.
Salamone J.D., *Lalies M.D., Channell S.L., Iversen S.D.* Behavioural and pharmacological characterization of the mouth movements induced by muscarinic agonists in the rat // Psychopharmacology (Berl). 1986. Vol. 88. P. 467-471.
Salkovic-Petrisic M., Tribl F., Schmidt M. et al. Alzheimer-like changes in protein kinase B and glycogen synthase kinase-3 in rat frontal cortex and hippocampus after damage to the insulin signalling pathway // J. Neurochem. 2006. Vol. 96. P. 1005-1015.

Salkovic-Petrisic M., *Knezovic A., Hoyer S., Riederer P.* What have we learned from the streptozotocin-induced animal model of sporadic Alzheimer's disease, about the therapeutic strategies in Alzheimer's research // J. Neural. Transm. 2013. Vol. 120. P. 233-252.

Sanchez R.M., *Ribak C.E., Shapiro L.A.* Synaptic connections of hilar basal dendrites of dentate granule cells in a neonatal hypoxia model of epilepsy // Epilepsia. 2012. Vol. 53. Suppl. 1. P. 98-108.

Santos H.R., Cintra W.M., Aracava Y. et al. Spine density and dendritic branching pattern of hippocampal CA1 pyramidal neurons in neonatal rats chronically exposed to the organophosphate paraoxon // Neurotoxicology. 2004. Vol. 25. P. 481-494.

Saura C.A., *Chen G., Malkani S. et al.* Conditional inactivation of presenilin 1 prevents amyloid accumulation and temporarily rescues contextual and spatial working memory impairments in amyloid precursor protein transgenic mice // J. Neurosci. 2005. Vol. 25. P. 6755-6764.

Schliebs R., Arendt T. The cholinergic system in aging and neuronal degeneration // Behav. Brain. Res. 2011. Vol. 221. P. 555-563.

Segal M. Dendritic spines, synaptic plasticity and neuronal survival: activity shapes dendritic spines to enhance neuronal viability // Eur. J. Neurosci. 2010. Vol. 31. P. 2178-2184.

Shapiro L.A., *Ribak C.E.* Integration of newly born dentate granule cells into adult brains: hypotheses based on normal and epileptic rodents // Brain. Res. Rev. 2005. Vol. 48. P. 43-56.

Schaeffer E.L., Figueiro M., Gattaz W. F. Insights into Alzheimer disease pathogenesis from studies in transgenic animal models // Clinics (Sao Paulo). 2011. Vol. 66. Suppl 1. P. 45-54.

Snigdha S., *Smith E.D., Prieto G.A. et al.* Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death // Neurosci. Bull. 2012. Vol. 28. P. 14-24.

Sousa N., *Lukoyanov N.V., Madeira M.D. et al.* Reorganization of the morphology of hippocampal neurites and synapses after stress-induced damage correlates with behavioral improvement // Neurosci. 2000. Vol. 97. P. 253-66.

Sultana R., *Banks W.A., Butterfield D.A.* Decreased levels of PSD95 and two associated proteins and increased levels of BCl2 and caspase3 in hippocampus from subjects with amnestic mild cognitive impairment: Insights into their potential roles for loss of synapses and memory, accumulation of Aβ, and neurodegeneration in a prodromal stage of Alzheimer's disease // J. Neurosci. Res. 2010. Vol. 88. P. 469-77.

Takeda S., Sato N., Niisato K. et al., Validation of Aβ1-40 administration into mouse cerebroventricles as an animal model for Alzheimer disease // Brain. Res. 2009. Vol. 1280. P. 137-147.

Vasilev D.S.,Tumanova N.L., Dubrovskaya N.M. et al. Prenatal hypoxia affects neuronal generation and migration with selective impact on different cell populations in rat neocortex // FENS Forum for Neuroscience. Barselona, 2012. Abstract Number 2225.

Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V. et al. Amyloid-β oligomers: their production, toxicity and therapeutic inhibition // Biochem. Soc. Trans. 2002. Vol. 30. P. 552-557.

Weinreb O., Mandel S., Amit T. et al. Neurological mechanisms of greentea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases // J. Nutr. Biochem. 2004. Vol. 15. P. 506-16.

Wiley R.G., Oeltmann T.N., Lappi D.A. Immunolesioning: selective destruction of neurons using immunotoxin to rat NGF receptor // Brain. Res. 1991. Vol. 562. P. 149-153.

Zhu Z.J., *Wu K.C., Qian Z.M. et al. Drosophila* models for studying iron-related neurodegenerative diseases // Sheng Li Xue Bao. 2014. Vol. 66. P. 47-54.

Zito K., Scheuss V., Knott G. et al. Rapid functional maturation of nascent dendritic spines // Neuron. 2009. Vol. 61. P. 247-258.

Моделирование патогенеза нейродегенеративных заболеваний на *Drosophila melanogaster*

С.В. Саранцева, А.Л. Шварцман

Содержание

1. Преимущества *Drosophila melanogaster* для моделирования нейродегенеративных заболеваний человека
2. Болезнь Альцгеймера и генетический скрининг новых мишеней для разработки терапевтических препаратов
3. Полинейропатии, обусловленные мутациями в гене транстиретина
4. Прионные заболевания
5. *Drosophila melanogaster* – модельная система для изучения потенциальных терапевтических соединений
6. Заключение

1. Преимущества *Drosophila melanogaster* для моделирования нейродегенеративных заболеваний человека

Одним из наиболее интересных подходов к исследованию генетических форм болезней человека является их моделирование на плодовой мушке *Drosophila melanogaster*. Для этих целей используют два основных экспериментальных подхода: экспрессия в *Drosophila* генов человека, играющих роль в развитии заболеваний, и изучение собственных генов *Drosophila*, ортологов генов человека, причастных к развитию заболеваний (Bier, 2005; Bilen, Bonini, 2005; Marsh, Thompson, 2006; Lu, Voger, 2009; Hirth, 2010). Расшифровка геномов человека и дрозофилы показала, что более 50% генов *Drosophila melanogaster* имеют гомологов у человека, и в то же время не менее 60–70% генов наследственных болезней человека имеют своих двойников у *Drosophila* (Fortini et al., 2000; Reiter et al., 2001). Поэтому при работе с различными моделями заболеваний на *Drosophila* прямое исследование мутантного белка может в значительной степени характеризовать его участие в патогенезе заболевания у человека. Более того, использование трансгенной технологии позволяет создавать линии, несущие гены человека, и использовать их для модуляции конкретных физиологических механизмов. С другой стороны, генетические эксперименты с выключением генов могут быть основой для определения неизвестных клеточных функции белков, вовлеченных в развитие патологического процесса. Хорошо разработанный на дрозофиле метод получения трансгенных

Сокращения: апоЕ – аполипопротеин Е; БА – болезнь Альцгеймера; ДВД – долговременная депрессия; МЭ – мобильный генетический элемент; Аβ – амилоидный пептид β; APP – белок-предшественник амилоида; FAC – семейная амилоидная кардиопатия; FAP – семейная амилоидная полинейропатия; HTS – высокоэффективный скрининг; PSN – пресенилин; SSA – системный старческий амилоидоз; TTR – транстиретин.

особей позволяет получать трансгенных мух не только по определенному гену, но и запускать экспрессию этого гена в тканях на различных стадиях онтогенеза дрозофилы, благодаря бинарной системе UAS-GAL4 (Brand, Perrimon, 1993). Система, заимствованная из дрожжей, состоит из двух независимых линий, одна из которых несет исследуемый ген под контролем последовательности UAS (Upstream Activating Sequence), а вторая линия содержит активатор транскрипции – транскрипционный фактор GAL4. Для индукции экспрессии трансгена UAS линия скрещивается с линией, экспрессирующей GAL4 под контролем эндогенного или специально сконструированного промотора, что приводит к экспрессии исследуемого гена в тканях, где экспрессируется GAL4. На сегодняшний день для исследователей доступно более 7000 линий Drosophila с экспрессией GAL4 по данным GAL4 Enhancer Trap Data Base (http://kyotofly.kit.jp/stocks/GETDB/getdb.html) и более 500 линий в Bloomington Drosophila Stock Center at Indiana University (http://flystocks.bio.indiana.edu).

Температурно-зависимый характер экспрессии трансгенов в системе UAS-GAL4 был использован для создания системы экспрессии, контролирумой во времени (temporal and regional gene expression targeting, TARGET) (McGuire, 2003). TARGET-система основана на способности дрожжевого белка GAL80 подавлять экспрессию GAL4. Совместная экспрессия UAS-GAL4 линий и температурно-зависимого аллеля $Gal80^{TS}$ (Matsumoto et al., 1978), под контролем промотора *tubulin 1α* приводит к наибольшему подавлению экспрессии GAL4 при 19°C и дерепрессии синтеза этого белка при 30°C.

Другой подход для направленной временной экспрессии генов на основе системы UAS-GAL4 основан на создании гормон-индуцибельных химерных вариантов GAL4:Gal4-estrogen receptor (Han, 2002) и GAL4-progesterone receptor (GeneSwitch) (Osterwalder et al., 2001; Roman et al., 2001; Nicholson et al., 2008). Экспрессия трансгенов контролируется добавлением лигандов в корм мухам или личинкам в определенное время, что позволяет исключить пагубное действие ранней экспрессии. Однако это накладывает ограничение на использование этих подходов на эмбриональной и куколочной стадиях развития (Elliott, Brand, 2008).

На *Drosophila melanogaster* был разработан и получил широкое распространение метод инсерционного мутагенеза, основанный на применении мобильных генетических элементов (МЭ). МЭ представляют собой сегменты ДНК, способные к автономным перемещениям (транспозициям) внутри генома. Доля мобильных элементов в геноме человека и млекопитающих может достигать 40% всей ядерной ДНК (Kazazian, 2004). Количество копий мобильных элементов различных семейств изменяется от одной до нескольких сотен. Инсерция МЭ может существенно изменять характер экспрессии гена, что и послужило поводом для широкого применения МЭ в создании регулируемых тканеспецифических экспрессионных векторов (Rørth, 1996; Staudt et al., 2005; Enerly et al., 2002). Наибольшее распространение в исследованиях на дрозофиле получили векторы, созданные на основе мобильного P-элемента (Adams, Sekelsky, 2002; Bellen et al., 2004), однако свойство P-элемента встраиваться только в определенные районы генома ограничивает проведение мутагенеза в целом геноме. Поэтому в настоящее время разрабатываются

подходы с использованием других мобильных элементов, предпочитающих отличные от P-элемента сайты инсерции, в частности *hobo* (Smith et al., 1993; Huet et al., 2002; Myrick et al., 2009) и *Minos* (Metaxakis et al., 2005).

Следует отметить, что использование Drosophila позволяет избежать таких ограничений, возникающих в работе с человеческим материалом, как неполные родословные, генетическая гетерогенность популяции, длительность сбора образцов. В то же время, фундаментальные аспекты клеточной биологии, такие как регуляция экспрессии генов, мембранный транспорт, передача клеточных сигналов, синаптогенез, клеточная гибель, нейротрансмиттерные системы, довольно похожи у человека и *Drosophila* (Sang, Jackson, 2005).

2. Болезнь Альцгеймера и генетический скрининг новых мишеней для разработки терапевтических препаратов

Болезнь Альцгеймера (БА) характеризуется прогрессирующим снижением когнитивных функций, в первую очередь памяти, а также развитием поведенческих расстройств (Иллариошкин, 2003). Это заболевание является наиболее частой причиной деменции в пожилом и старческом возрасте. Нейропатологические изменения в мозге больных БА проявляются в накоплении в цитоплазме нейронов нейрофибриллярных агрегатов тау-белка и экстраклеточных отложений амилоида в форме так называемых сенильных бляшек. Основным компонентом сенильных бляшек является пептид размером 40–42 аминокислоты, названный амилоидным пептидом β (Aβ). Aβ является продуктом протеолитического расщепления большого трансмембранного белка, получившего название Amyloid Precursor Protein (APP). Функция APP до конца еще не известна, что во многом затрудняет понимание основ патологического процесса. В норме Aβ в наномолярных количествах обнаруживается в кровотоке и спинномозговой жидкости, однако при БА происходит его локальное накопление в мозге, ведущее к гибели нейронов. Согласно современным представлениям, накопление токсических интермедиатов амилоидных фибрилл в мозге является центральным звеном во всех нейропатологических процессах, включая дисфункцию синапсов, нейродегенерацию, гибель нейронов и развитие деменции (DeStrooper, Annaert, 2001; Hardy, Selkoe, 2002; Selkoe, 1998). При этом значительная часть работ указывает, что такими интермедиатами могут являться растворимые олигомеры Aβ (Walsh, Selkoe, 2004; Haass, Selkoe, 2007).

В протеолитический процессинг APP, ведущий к образованию Aβ, вовлечены β-секретаза (трансмембранная гликозил-аспартил-протеаза), получившая название BACE, и γ-секретаза, представляющая собой сложный белковый комплекс, основным компонентом которого являются трансмембранные белки пресенилин 1 (PSN1) или пресенилин 2 (PSN2) (DeStrooper, Annaert, 2000). Все известные на сегодняшний день семейные формы БА связаны с мутациями в генах *APP, PSN1, PSN2* (Selkoe, 1999). В геноме *Drosophila melanogaster* содержатся ортологи генов пресенелина (*Psn*) (Ye, Fortini, 1998) и *APP* (*Appl*) (Luo et al, 1990).

Appl характеризуется высокой степенью гомологии с APP, подвергается аналогичному протеолитическому расщеплению, но не содержит последовательности, необходимой для генерации Аβ (Luo et al., 1990; Rosen et al., 1989). Выключение *Appl* не приводило к летальному эффекту, но вызывало значительное изменение поведенческих реакций, которые восстанавливались при экспрессии *APP*, что говорит о функциональном консерватизме между *Appl Drosophila* и *APP* человека (Luo et al., 1992). Целый ряд исследований указывает на ключевую роль *Appl* в формировании и поддержании синапсов у *Drosophila* (Ashley et al., 2005; Torroja et al., 1999b). Эксперименты по определению локализации *Appl* показали значительное обогащение *Appl* в растущих аксонах и синаптических структурах, а также участие *Appl* в образовании и дифференцировке синапсов в нейромышечных контактах личинок (Torroja et al., 1999b). Гиперэкспрессия как *Appl*, так и *APP* человека вызывала нарушение аксонного транспорта (Gunawardena, Goldstein, 2001; Torroja et al., 1999a). При гиперэкспрессии *APP* человека в *Drosophila melanogaster* он также транспортировался в пресинаптический терминал нейронов и постсинаптические участки нейромышечных контактов (Yagi et al., 2000).

При моделировании БА на *Drosophila melanogaster* наиболее часто используют прямую экспрессию последовательности Аβ (Iijima-Ando, Iijima, 2010; Moloney et al., 2010) в *Drosophila*. Так А. Финелли с коллегами были получены линии дрозофилы, в тканях нервной системы которых экспрессировались последовательности Аβ, кодирующие пептиды разной длины (соответственно $А\beta_{1-40}$ и $А\beta_{1-42}$) (Finelli et al., 2004). У мух, несущих в геноме последовательность более амилоидогенного $А\beta_{1-42}$, были выявлены диффузные амилоидные отложения и гибель нейронов. Эти нейропатологические процессы сопровождались прогрессирующими с возрастом дефектами в поведении, а также сокращением продолжительности жизни. Иная картина наблюдалась у трансгенных мух, несущих последовательности менее амилоидогенного $А\beta_{1-40}$: отсутствие накопления амилоида и гибели нейронов на фоне все тех же усиливающихся с возрастом нарушений поведения (Iijima et al., 2004). Дальнейшие исследования показали, что $А\beta_{1-42}$ в *Drosophila* накапливается на начальных стадиях внутриклеточно и только потом детектируются его экстраклеточные депозиты (Crowther et al., 2005).

Для определения эффектов на синаптические функции эндогенно синтезируемого $А\beta_{1-42}$ его последовательность была экспрессирована в моторных нейронах и мышечных клетках личинок *Drosophila*. Оказалось, что образование $А\beta_{1-42}$ поразному влияло на синаптические функции в зависимости от типа клеток. Так, в нейронах, по мнению авторов, $А\beta_{1-42}$ главным образом был представлен в виде олигомеров, приводя к уменьшению амплитуды возбуждающих токов и не влияя на долговременную депрессию (ДВД), в то время как для мышечных клеток было характерно образование агрегатов большого размера, возможно фибрилл, и увеличение амплитуды возбуждающих токов и ДВД (Chiang et al., 2009). Применение вортамина, специфического ингибитора PI3 киназы, снижало ДВД до нормального уровня. Ингибирование PI3 киназы также улучшало способность к запоминанию, уменьшало количество $А\beta_{1-42}$ фибрилл в мозге мух, в то время как количество олигомеров уменьшалось незначительно (Chiang et al., 2010).

В другой работе нарушение синаптических функций, вызванное образованием $А\beta_{1-42}$ в нейромышечных контактах имаго, сопровождалось прогрессирующим с возрастом уменьшением пресинаптических и аксонных митохондрий, уменьшением их скорости перемещения по аксону. Причем значительное уменьшение числа пресинаптических митохондрий предшествовало наблюдаемым изменениям в синаптической трансмиссии и ультраструктуре синапсов. Экспрессия последовательности Аβс мутацией Arctic ($А\beta_{arc}$) значительно усиливала наблюдаемые фенотипы (Zhao et al., 2010).

Нарушение транспорта и распределения митохондрий, снижение уровня белков митохондрий, которое отмечается в мозге больных БА, предполагает, что разрушение функций митохондрий является одним из компонентов или механизмов патогенеза БА (Hirai et al., 2001). Аномальное распределение митохондрий в мозге наблюдалось у мух с экспрессией последовательности $А\beta_{1-42}$: они аккумулировались в нервных клетках, в то время как в аксонах и дендритах их число было редуцировано (Iijima-Ando et al., 2009). Однако сегодня пока трудно сказать, является ли нарушение функций митохондрий ранним проявлением в патогенезе заболевания или это всего лишь последовательное звено в патогенезе БА.

У *Drosophila* представлены все компоненты белкового комплекса, ответственного за активность γ-секретазы, но β-секретаза *Drosophila* не разрезает APP в β-сайте (Carmine-Simmen et al., 2009), при этом *APPL* не содержит последовательности Аβ, поэтому для полного протеолитического процессинга полноразмерного APP и повышенной секреции Аβ были созданы линии *Drosophila*, в фоторецепторных клетках глаза которых одновременно были экспрессированы *APP* и *BACE* человека и мутантные *PS1*, вызывающие семейные формы БА (Greeve et al., 2004). В рамках этой модели удалось воспроизвести наиболее важные патологические признаки БА, а именно – образование амилоидных отложений и гибель нервных клеток.

В своей работе, выполненной в рамках программы РАН «Фундаментальные науки медицины», мы провели экспрессию *APP* и *BACE* человека в нервных клетках *Drosophila*. У мух развивалась прогрессирующая с возрастом нейродегенерация в мозге, нарушение способности к обучению и запоминанию, а также уменьшение плотности синаптических белков в грибовидном теле мозга *Drosophila*. Интересно, подобные нарушения наблюдались у мух с экспрессией полноразмерного *APP* или *APP* с мутацией *Swedish*, независимо от секреции Аβ (Sarantseva et al., 2009a,b; Большакова и др., 2013). Следовательно, можно предположить, что мутантный *APP* или другие фрагменты его протеолиза могут иметь нейротоксичные свойства. Недавно было установлено, что неамилоидогенные фрагменты *APP*, которые также обнаруживаются в амилоидных депозитах, как и Аβ-пептид, обладают способностью формировать ионные каналы, вызывая выброс кальция, разрушение нейритов и гибель нейронов (Jang et al., 2010). В этой связи следует отметить, что роль Аβ как основного фактора в патогенезе БА широко дискутируется в настоящее время (Mullane, Williams, 2013).

Исходя из вышеперечисленных биологических особенностей и разработанных генетических методов на *Drosophila* часто и успешно проводят скрининг генов-модификаторов патологических процессов, что позволяет значительно ускорить про-

ведение исследований и снизить затраты на них. Для скрининга генетических модификаторов амилоидоза были использованы линии мух, экспрессирующие $A\beta_{42}$ в фоторецепторных клетках глаза (Finelli et al., 2004). Экспрессия $A\beta_{42}$ в глазах мух вызывала ярко выраженный фенотип, характеризующийся дезорганизацией фоторецепторных клеток и уменьшением размера глаз («rough eye»). Для скрининга была использована коллекция из 1963 линий дрозофилы, несущих в геноме вставки EP-транспозона. EP-транспозон является производным P-элемента, содержит промотор, активируемый GAL4, и в зависимости от сайта и ориентации инсерции модулирует активность генов. Все линии этой коллекции индивидуально скрещивались с мухами, экспрессирующими Aβ. Целью скрининга был поиск линий, в которых наблюдалась модуляция токсического эффекта Aβ, маркером которого являлся «rough eye»-фенотип. В результате скрининга фенотипов и последующего ДНК-анализа было выявлено 23 гена модификатора. Среди них – гены, участвующие в различных секреторных процессах, гомеостазе холестерина, а также регулирующие транскрипцию и ремоделирование хроматина. Анализ влияния модифицирующих мутаций на общий уровень Aβ и уровень растворимого Aβ показал, что восемь мутаций статистически достоверно изменяют общий уровень Aβ, при этом в 7 случаях изменения варьировали в пределах 20–30% и только в одной из линий, несущей инсерцию в регуляторной зоне гена неприлизина 2 (*nep2*), наблюдалось снижение общего уровня Aβ на 70% (Cao et al., 2008; Finelli et al., 2004). Деградация Aβ неприлизином, являющимся одной из мажорных нейропептидаз мозга, была доказана также при исследовании мышей с нокаутом гена неприлизина (Iwata et al., 2001, 2005). У этих мышей была резко снижена скорость деградации C^{14}-Aβ по сравнению с мышами дикого типа. На основании этих экспериментов было выдвинуто предположение, что повышение экспрессии неприлизина может быть одной из стратегических задач в подавлении амилоидоза при болезни Альцгеймера. Однако хроническая гиперэкспрессия неприлизина человека в нервных клетках *Drosophila* наравне с уменьшением нейродегенерации и внутриклеточных депозитов $A\beta_{42}$ сокращала продолжительность жизни мух, вызывала прогрессирующую с возрастом дегенерацию аксонов в мозге и уменьшение транскрипции, контролируемой CREB (Cao et al., 2008).

В настоящее время показано, что нормальные клеточные функции других белков, участвующих в патогенезе БА, – пресенилинов, не исчерпываются их участием в γ-секретазном комплексе и требуют дальнейшего изучения (Baki et al., 2004; Bentahir et al., 2006; Singh et al., 2001; Saura et al., 2004; Schwarzman et al., 1999). Для понимания функций пресенилинов был проведен поиск генетических модификаторов, модулирующих фенотип в крыльях и груди *Drosophila*, обусловленный гиперэкспрессией пресенилина. Было выявлено 177 модификаторов, среди которых – белки, регулирующие гомеостаз кальция, ответ организма на стресс и упаковку белков, а также компоненты сигнальной трансдукции, апоптотические факторы и белки клеточного цикла. При этом 58 модификаторов взаимодействовали также с APP. Наличие среди них белков, регулирующих гомеостаз кальция (Calmodulin, sarcoplasmic calciumbinding protein, Ryanodine receptor), указывает на связь между пресенелинами, APP и регуляцией кальция и предполагает, что она может играть важную роль в патогенезе БА (Van de Hoef et al., 2009).

3. Полинейропатии, обусловленные мутациями в гене транстиретина

Транстиретин (TTR), белок плазмы крови, образующийся преимущественно в печени, сосудистом сплетении желудочков мозга и в пигментном эпителии сетчатки глаза, является основным транспортером тироксина и ретинол-связывающего белка у млекопитающих (Goodman, 1987; Woeber, Ingbar, 1968). К заболеваниям человека, характеризующимся экстраклеточными отложениями агрегатов транстиретина, относятся семейная амилоидная полинейропатия (Familial Amyloidotic Polyneuropathy, FAP), семейная амилоидная кардиопатия (Familial Amyloidotic Cardiomyopathy, FAC) и системный старческий амилоидоз (Senile Systemic Amyloidosis, SSA). SSA – наиболее распространенная форма транстиретин-ассоциированного амилоидоза, спорадическое заболевание, вызываемое агрегацией транстиретина дикого типа, при котором наблюдается поражение сердца, головного мозга, поджелудочной железы (Westermark et al., 1990). FAP и FAC являются наследственными атосомно-доминантными формами и обусловлены мутациями в гене транстиретина. В настоящее время у человека описано более 100 амилоидогенных и около 15 неамилоидогенных мутаций в TTR, большинство из которых вызывают полинейропатию (Connors et al., 2003; http://www.bumc.bu.edu/Dept/Content.aspx?DepartmentID=354&PageID=5530). TTR вовлечен в обмен Aβ, основного компонента амилоидных отложений при болезни Альцгеймера (Liu, Murphy, 2006; Schwarzman et al., 1994). Более того, связываясь с Aβ, TTR предотвращал агрегацию Aβ и образование амилоида как *in vitro*, так и *in vivo* (Choi et al., 2007; Buxbaum et al., 2008). Несмотря на то что *Drosophila* не имеет явного TTR-гомолога, экспрессия двух его клинических форм TTRV30M (Berg et al., 2009) и TTRL55P (Pokrzywa et al., 2007), ответственных за возникновение семейной амилоидной полинейропатии, а также мутантной формы TTR-A (Pokrzywa et al., 2007) с двумя аминокислотными заменами (TTRV14N/V16E) (Olofsson et al., 2001) приводила к возникновению фенотипов, частично напоминающих патологию у человека. При экспрессии TTRV30M в нервных клетках *Drosophila* в мозге взрослых мух образовывались амилоидные соединения, детектируемые окраской Конго красным, сокращалась продолжительность жизни, развивалась нейродегенерация в мозге и нарушение поведения. В то же время, у мух, экспрессирующих TTR дикого типа, указанные нарушения проявлялись намного слабее и лишь незначительно отличались от контроля, несмотря на наличии амилоидных отложений в мозге (Berg et al., 2009). Подобные результаты были получены при экспрессии TTRL55P и TTR-A (Pokrzywa et al., 2007). Интересно, что экспрессия трех форм TTRL55P, TTR-AandTTRwt вызывала изменение морфологии крыльев («dragged-wing»-фенотип). Образующиеся агрегаты TTR обладали различной токсичностью. Так, наиболее токсичными оказались агрегаты, выделенные из гемолимфы и жирового тела мух, с экспрессией TTR-A (Pokrzywa et al., 2010).

Линии *Drosophila* с экспрессией TTR могут помочь ответить на специфические вопросы, касающиеся биологии TTR. Так, было показано, что амилоид P сыворотки (Serumamyloid Pcomponent, SAP), являющийся одним из основных компонентов

сенильных бляшек в мозге, может взаимодействовать с TTR, ингибируя его агрегацию и предотвращая нейродегенерацию фоторецепторных клеток глаза *Drosophila* (Andersson et al., 2013). Хотя биологическая значимость этого взаимодействия, как и многих других, идентифицированных в последнее время (Liz et al., 2009), остается не вполне ясной, использование простой генетической системы, такой как *Drosophila*, может иметь ключевую роль в понимании клеточных процессов, в которых эти взаимодействия имеют место.

4. Прионные заболевания

Прионные заболевания (трансмиссивные спонгиоформные энцефалопатии) представляют собой одну из форм первичных церебральных амилоидозов. В настоящее время выделяют ряд форм прионных заболеваний животных (скрепи овец и коз, губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота («коровье бешенство») и хроническая изнуряющая болезнь оленей и лосей), а также прионные болезни человека – синдром Герстмана–Штраусслера–Шейнкера, фатальная семейная бессонница, болезнь Крейтцфельдта–Якоба и куру (Prusiner, 1998a,b; Prusiner, Hsiao, 1994). Эти заболевания могут иметь спорадическую, наследственную или инфекционную природу и приводить к спонгиоформной вакуолизации серого вещества головного мозга, разрастанию астроцитарной глии, дисфункции синапсов, гибели нейронов практически во всех отделах мозга, а также к отложеению в паренхиме мозга амилоидных депозитов, состоящих из протеазо-резистентной патологической изоформы прионного белка (Aguzzi et al., 2008). Абсолютное большинство прионных болезней человека представлено спорадическими случаями, и около 10–15% представляют собой моногенные наследственные заболевания, передающиеся по аутосомно-доминантному типу и обусловленные мутациями в гене *PRNP*. В настоящее время описано более 30 мутаций в гене *PRNP*, которые подразделяют на три класса: точковые мутации в кодирующей области гена, приводящие к изменению аминокислотной последовательности или образованию стоп-кодонов и вставки дополнительных копий октапептид-кодирующего повтора (Mead, 2006). Своеобразие прионных болезней связано с возможностью развития трансмиссивных форм этих заболеваний, которые возникают при попадании в организм патологической изоформы прионного белка, инициирующей при контакте с нормальными молекулами самоподдерживающий процесс трансформации последних в аномальные конформеры. Нормальная клеточная изоформа прионного белка PrP^{C} представляет собой растворимый мономерный белок, который в норме синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме и легко подвергается протеолитическому расщеплению. Согласно современным представлениям, центральным патогенетическим событием в развитии прионных болезней является спонтанная конверсия нормальной клеточной изоформы прионного белка PrP^{C} в его патологическую изоформу PrP^{Sc} (Prusiner, 1998a,b). Как PrP^{C} превращается в PrP^{Sc}, как реплицируется PrP^{Sc} и почему его накопление вызывает дегенерацию нейронов, остается не вполне понятным.

Первые попытки создания модели прионных болезней на *Drosophila* оказались неудачными. Так, экспрессия *PrP* сирийского хомячка (*SHaPrP*) под контролем промотора теплового шока Hsp70 не приводила к развитию нейропатологии: накоплению протеазо-резистентных SHaPrP-форм и не сказывалась на продолжительности жизни мух, что, возможно, являлось следствием низкой экспрессии *SHaPrP* под контролем Hsp70 промотора и (или) влиянием шаперонов на фолдинг PrP (Raeber et al., 1995). Используя систему GAL4-UAS H.P. Делаулт с соавторами (Deleault et al.. 2003) провели экспрессию *PrP* дикого типа мыши (*MoPrP*) и мутантной формы *PrP* человека (PG14) (Krasemann et al., 1995), содержащую девять копий октопептид-кодирующего повтора и ответственную за развитие семейной формы болезни Крейтцфельдта–Якоба, в нервных клетках и фоторецепторных клетках глаза *Drosophila*. Так же как и в первом случае, у мух с экспрессией дикого типа MoPrP не было выявлено клинических и патологических нарушений. Однако, хотя экспрессия PG14 не приводила к нейродегенерации и нарушениям поведения, PG14 накапливался в глазах мух и лишь в небольшом количестве в мозге, что дало авторам возможность предположить наличие в нейронах *Drosophila* специального механизма, предотвращающего аккумуляцию в мозге токсичного PG14 (Deleault et al., 2003).

Больших успехов удалось добиться при экспрессии в холинергических и дофаминергических нейронах *Drosophila* гена прионного белка мыши с мутацией замены пролина на лейцин (MoPrP P101L), гомологичной мутации P101L человека, приводящей к развитию синдрома Герстмана–Штраусслера–Шейнкера (Gavin et al., 2006). Для MoPrP P101L мух было характерно уменьшение продолжительности жизни и нарушение поведения, а также нейродегенерация, проявляющаяся в виде вакуолей, и образование агрегатов PrP. В работе также была показана чувствительность нейронов разного типа к экспрессии MoPrP P101L. Однако, по признанию самих авторов, созданная ими модель может описывать лишь частный случай одной из семейных форм заболевания, поскольку авторам не удалось воспроизвести одни из основных морфологических признаков прионных болезней, а именно – аккумуляцию в мозге протеаза-резистентного PrP, что все же не исключает использование данной модели для поиска генов-модификаторов P101L фенотипа (Gavin et al., 2006).

Для изучения механизмов, регулирующих спонтанное изменение конформации PrP, ген приона дикого типа сирийского (*SHaPrP*) был экспрессирован в *Drosophila* GAL-UAS системе (Fernandez-Funez et al., 2009). Эта первая удачная попытка по созданию на *Drosophila* спорадической формы прионных болезней. Было показано, что наблюдаемые у трансгенных SHaPrP мух сокращение продолжительности жизни, нарушение поведения и губчатоподобная дегенерация мозга вызваны аккумуляцией нерастворимого PrP. Однако в мозге трансгенных мух не накапливался PrP, резистентный к протеазе К, что указывает на способность PrP дикого типа вызывать дегенеративные изменения в отсутствие PrP^{Sc} (Fernandez-Funez et al., 2009). В настоящее время описан ряд прионных заболеваний человека спорадического характера с накоплением в мозге больных нерастворимых PrP, чувствительных к протеиназе К, которые получили название прионопатии, чувствительные к протеазе (proteasesensitive prionopathy, PSPr) (Brown et al., 1994; Rodríguez-Martínez et al.,

2010; Tateishi, Kitamoto, 1995; Zou et al., 2010). На наш взгляд, дальнейшие исследования на *Drosophila* могут приблизить к пониманию механизмов патогенеза этой группы заболеваний.

Роль молекулярных шаперонов в предотвращении нейродегенерации ранее была исследована на моделях спиноцеребральной атаксии, болезни Паркинсона, полиглутаминовых заболеваний. П. Фернандес-Фунс с коллегами, используя *Drosophila*, впервые *in vivo* удалось показать способность Hsp 70 препятствовать конформационным изменениям прионного белка (Fernandez-Funez et al., 2009).

5. *Drosophila melanogaster* – модельная система для изучения потенциальных терапевтических соединений

В настоящее время *Drosophila melanogaster* широко используется не только для изучения патогенеза нейродегенеративных заболеваний, но и для поиска средств лечения этих заболеваний (Crowther et al., 2005). Это могут быть как химические вещества, которые добавляют в корм, так и вещества пептидной природы, эффект которых изучают при их генетической экспрессии в организме (Nagai et al., 2003). На сегодняшний день имеется несколько работ, проведенных на *Drosophila,* где тестировались соединения для лечения БА (Finelli et al., 2004; Greeve et al., 2004; Chakraborty et al., 2011), которые добавлялись непосредственно в питательную среду для мух. Химические модуляторы процессинга APP, ингибирующие γ-секретазу, приводили к снижению уровня Aβ, уменьшению нейродегенерации и увеличению жизни животных (Finelli et al., 2004; Chakraborty et al., 2011). Надо отметить, что в последнее время число работ по тестированию различных потенциальных терапевтических соединений на *Drosophila melanogaster* постоянно растет (Pandey, Nichols, 2011).

В рамках программы РАН «Фундаментальные науки – медицине» на трансгенных линиях *Drosophila melanogaster* с экспрессией генов человека APP и β-секретазы мы провели изучение нейропротекторных свойств пептидных миметиков аполипопротеина Е, включающих аминокислотную последовательность рецептор-связывающего домена аполипопротеина Е (апоЕ). Инъекции миметиков апоЕ уменьшали нейродегенерацию в мозге трансгенных мух и восстанавливали когнитивные функции (способность к распознаванию запахов). Полученные результаты позволяют предположить, что миметики апоЕ являются перспективными нейропротекторами для разработки терапии БА.

В дополнение к тестированию фармакологических соединений *Drosophila* является превосходной моделью для проведения высокоэффективных скринингов (HTS) химических библиотек потенциальных терапевтических соединений. Проведение HTS на млекопитающих требует немалых средств, а имеющиеся сегодня *in vitro* модели не в полной мере воспроизводят ключевые черты заболеваний. Использование *Drosophila* как первичного фильтра при проведении HTS позволяет значительно уменьшить количество соединений для дальнейшего тестирования на моделях млекопитающих (Giacomotto, Ségalat, 2010).

6. Заключение

Трансгенные линии *Drosophila* воспроизводят многие ключевые признаки НДЗ. В то же время, не следует ожидать, что на этих моделях будут полностью повторены все особенности болезней человека. Пожалуй, моделирование НДЗ на *Drosophila* должны рассматриваться как создание чувствительной генетической системы, которая предоставляет возможность быстро и сравнительно недорого выявлять клеточные процессы, вовлеченные в патогенез заболеваний, генетические модификаторы этих процессов, а также тестировать потенциальные терапевтические агенты на многоклеточном организме. Конечно, обязательным условием является проверка открытых на Drosophila новых механизмов и молекул на моделях млекопитающих. Открытие генетических модификаторов в *Drosophila* поможет выявить соответствующие гены у человека и, следовательно, новые терапевтические мишени.

Литература

Большакова О.И., Жук А.А., Родин Д.И. и др. Влияние гиперэкспрессии гена APP человека на холинергические и дофаминергические нейроны *Drosophila melanogaster* // Экологическая генетика. 2013. Т. XI. № 1. С.23-31.

Илларионкин С.Н. Конформационные болезни мозга. М.: Янус-К, 2003. 246 с.

Adams M.D., Sekelsky J.J. From sequence to phenotype: reverse genetics in Drosophila melanogaster // Nat. Rev. Genet. 2002. Vol. 3. P. 189-198.

Aguzzi A., Baumann F., Bremer J. The Prion's Elusive Reason for Being // Annu. Rev. Neurosci. 2008. Vol. 31. P. 439-477.

Andersson K., Pokrzywa M., Dacklin I., Lundgren E. Inhibition of TTR aggregation-induced cell death--a new role for serum amyloid P component // PLoS One. 2013. Vol. 8. P. e55766.

Ashley J., Packard M. Ataman B., Budnik V. Fasciclin II signals new synapse formation through amyloid precursor protein and the scaffolding protein dX11/Mint // J. Neurosci. 2005. Vol. 25. P. 5943-5955.

Baki L., Shioi J., Wen P. et al. PS1 activates PI3K thus inhibiting GSK-3 activity and tau overphosphorylation: effects of FAD mutations // EMBO J. 2004. Vol. 23. P. 2586-2596.

Bellen H.J., Levis R.W., Liao G. et al. The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of Drosophila genes // Genetics. 2004. Vol. 167. P. 761-781.

Bentahir M., Nyabi O.,Verhamme J. et al. Presenilin clinical mutations can affect c-secretase activity by different mechanisms // J. Neurochem. 2006. Vol. 96. P. 732-742.

Berg I., Thor S., Hammarström P. Modeling familial amyloidotic polyneuropathy (Transthyretin V30M) in Drosophila melanogaster // Neurodegener. Dis. 2009. Vol.6. P. 127-38.

Bier E. Drosophila, the golden bug, emerges as a tool for human genetics // Nat. Rev. Genet. 2005. Vol. 6. P. 9-23.

Bilen J., Bonini N.M. Drosophila as a model for human neurodegenerative disease // Annu. Rev. Genet. 2005. Vol.39. P. 153-171.

Brand A.H., Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes // Development. 1993. Vol. 118. P. 401-415.

Brown P., Gibbs C.J., Rodgers-Johnson P. et al. Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health series of 300 cases of experimentally transmitted disease // Ann. Neurol. 1994. Vol. 35. P. 513-529.

Buxbaum J.N., Ye Z., Reixach N. et al. Transthyretin protects Alzheimer's mice from the behavioral and biochemical effects of Abeta toxicity // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. Vol. 105. P. 2681-2686.

Cao W., Song H.J., Gangi T. et al. Identification of novel genes that modify phenotypes induced by Alzheimer's beta-amyloid overexpression in Drosophila // Genetics. 2008. Vol. 178. P. 1457-1457.

Carmine-Simmen K., Proctor T., Tschape J. et al. Neurotoxic effects induced by the Drosophila amyloid-beta peptide suggest a conserved toxic function // Neurobiol. Dis. 2009. Vol. 33. P. 274-281.
Chakraborty R., Vepuri V., MhatreS.D. et al. Characterization of a Drosophila Alzheimer's disease model: pharmacological rescue of cognitive defects // PLoS One. 2011. Vol. 6. P. e20799.
Chiang H.C., Iijima K., Hakker I., Zhong Y. Distinctive roles of different beta-amyloid 42 aggregates in modulation of synaptic functions // FASEB J. 2009. Vol. 23. P. 969-1977.
Chiang H.C., Wang L., Xie Z. et al. PI3 kinase signaling is involved in Abeta-induced memory loss in Drosophila // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. Vol. 107. P. 7060-7065.
Choi S.H., Leight S.N., Lee V.M. et al. Accelerated Abeta deposition in APPswe/PS1deltaE9 mice with hemizygous deletions of TTR (transthyretin) // J. Neurosci. 2007. Vol. 27. P. 7006–7010.
Connors L.H., Lim A., Prokaeva T. et al. Tabulation of human transthyretin (TTR) variants // Amyloid. 2003. Vol. 10. P. 160-184.
Crowther D.C., Kinghorn K.J., Miranda E. et al. Intraneuronal Abeta, nonamyloid aggregates and neurodegeneration in a Drosophila model of Alzheimer's disease // Neuroscience. 2005. Vol. 132. P. 123-135.
Deleault N.R., Dolph P.J., Feany M.B. et al. Post-transcriptional suppression of pathogenic prion protein expression in Drosophila neurons // J. Neurochem. 2003. Vol. 85. P. 1614-1623.
De Strooper B., Annaert W. Proteolytic processing and cell biological functions of the amyloid precursor protein // J. Cell Sci. 2000. Vol. 113. P. 1857-1870.
De Strooper B.D., Annaert W. Presenilins and the intramembrane proteolysis of proteins: facts and fiction // Nat. Cell. Biol. 2001. Vol. 3. P. 221-25.
Elliott D., Brand H. The GAL4 System. A versatile system for the expression of genes. Methods in molecular Biology: Drosophila: Methods and Protocols. Ed. C. Dahmann. Humana. Totowa, NY: Press Inc., 2008. P. 79-85.
Enerly E., Larsson J., Lambertsson A. Reverse genetics in Drosophila: from sequence to phenotype using UAS-RNAi transgenic flies // Genesis. 2002. Vol. 34. P. 152-155.
Fernandez-Funez P., Casas-Tinto S., Zhang Y. et al. In vivo generation of neurotoxic prion protein: role for hsp70 in accumulation of misfolded isoforms // PLoS Genet. 2009. Vol. 5. P. e1000507.
Finelli A., Kelkar A., Song H.-J. et al. A model for studying Alzheimer's AB42-induced toxicity in Drosophila melanogaster // Mol. Cell. Neurosci. 2004. Vol. 26. P. 365-375.
Fortini M.E., Skupski M.P., Boguski M.S., Hariharan I.K. A survey of human disease gene counterparts in the Drosophila genome // J. Cell. Biol. 2000. Vol. 150. P. 23-30.
Gavin B.A., Dolph M.J., Deleault N.R. et al. Accelerated accumulation of misfolded prion protein and spongiform degeneration in a Drosophila model of Gerstmann- Straussler-Scheinker syndrome // J. Neurosci. 2006. Vol. 26. P. 12408-12414.
Giacomotto J., Ségalat L. High-throughput screening and small animal models, where are we? // Br. J. Pharmacol. 2010. Vol. 160. P. 204-216.
Goodman D. Retinoids and retinol-binding proteins // Harvey Lect. 1987. Vol. 81. P. 111-132.
Greeve I., Kretzschmar D., Tschape J.A. et al. Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic Drosophila // J. Neurosci. 2004. Vol. 24. P. 3899-3906.
Gunawardena S., Goldstein L.S. Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in Drosophila // Neuron. 2001. Vol. 32. P. 389-401.
Haass C., Selkoe D.J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2007. Vol. 8. P. 101-112.
Han D.D., Stein D., Stevens L.M. Investigating the function of follicular subpopulations during Drosophila oogenesis through hormone-dependent enhancer-targeted cell ablation // Development. 2002. Vol. 127. P. 573-583.
Hardy J., Selkoe D.J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics // Science. 2002. Vol. 297. P. 353-356.
Hirai K., Aliev G., Nunomura A. et al. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease // J. Neurosci. 2001. Vol. 21. P. 3017-3023.
Hirth F. Drosophila melanogaster in the study of human neurodegeneration // CNS Neurol. Disord. Drug. Targets. 2010. Vol. 9. P. 504-23.
Huet F., Lu J.T., Myrick K.V. et al. A deletion-generator compound element allows deletion saturation analysis for genomewide phenotypic annotation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. Vol. 99. P. 9948-9953.

Iijima K., Liu H.-P., Chiang A.-S. et al. Dissecting the pathological effects of human Aβ40 and Aβ42 in Drosophila: A potential model for Alzheimer's disease // PNAS. 2004. Vol. 101. P. 6623-6628.
Iijima K., Chiang H.C., Hearn S. A. et. al. Abeta42 mutants with different aggregation profiles induce distinct pathologies in Drosophila // PLoS One. 2008. Vol. 1-9. P. e1703.
Iijima-Ando K., Iijima K. Transgenic Drosophila models of Alzheimer's disease and tauopathies // Brain. Struct. Funct. 2010. Vol. 214. P. 245-262.
Iijima-Ando K., Hearn S.A., Shenton C. et al. Mitochondrial Mislocalization Underlies Ab42-Induced Neuronal Dysfunction in a Drosophila Model of Alzheimer's Disease // PLoS One. 2009. Vol. 4. P. e8310.
Iwata N., Tsubuki S., Takaki Y. et al. Metabolic regulation of brain Ah by neprilysin // Science. 2001. Vol. 292. P. 1550-1552.
Iwata N., Higuchi M., Saido T. Metabolism of amyloid-β peptide and Alzheimer's disease // Pharmacology & Therapeutics. 2005. Vol. 108. P. 129-148.
Jang H., Arce F.T., Ramachandran S. et al. Truncated beta-amyloid peptide channels provide an alternative mechanism for Alzheimer's Disease and Down syndrome // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. Vol. 107. P. 6538-6543.
Kazazian H.H. Mobile elements: drivers of genome evolution // Science. 2004. Vol. 303. P. 1626-1632.
Krasemann S., Zerr I., Weber T. et al. Prior disease associated with a bovel nine octapeptide repeat insertion in the PRNP gene // Brain Res. Vol. Brain Res. 1995. Vol. 34. P. 173-176.
Liu L., Murphy R.M. Kinetics of inhibition of beta-amyloid aggregation by transthyretin // Biochemistry. 2006. Vol. 45. P. 15702-15709.
Liz M.A., Fleming C.E., Nunes A.F. et al. Substrate specificity of transthyretin: identification of natural substrates in the nervous system // Biochem. J. 2009. Vol. 419. P. 467-474.
Lu B., Vogel H. Drosophila models of neurodegenerative diseases // Annu. Rev. Pathol. 2009. Vol. 4. P. 315-342.
Luo L.Q., Martin-Morris L.E., White K. Identification, secretion, and neural expression of APPL, a Drosophila protein similar to human amyloid protein precursor // J. Neurosci. 1990. Vol. 10. P. 3849-3861.
Luo L., Tully T., White K. Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for Appl gene // Neuron. 1992. Vol. 9. P. 59-605.
Marsh J.L., Thompson LM. Drosophila in the study of neurodegenerative disease // Neuron. 2006. Vol. 52. P. 169-78.
Matsumoto K., Toh-e A., Oshima,Y. Genetic control of galactokinase synthesis in Saccharomyces cerevisiae: evidence for constitutive expression of the positive regulatory gene gal4 // J. Bacteriol. 1978. Vol. 134. P. 446-457.
McGuire S.E., Le P.T., Osborn A.J. et al. Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in Drosophila // Science. 2003. Vol. 302. P. 1765-1768.
Mead S. Prion disease genetics // Eur. J. Hum. Genet. 2006. Vol. 14. P. 273-281.
Metaxakis A., Oehler S., Klinakis A., Savakis C. Minos as a genetic and genomic tool in Drosophila melanogaster // Genetics. 2005. Vol. 171. P. 571-581.
Moloney A., Sattelle D.B., Lomas D.A., Crowther D.C. Alzheimer's disease: insights from Drosophila melanogaster models // Trends Biochem. Sci. 2010. Vol. 35. P. 228-235.
Mullane K., Williams M. Alzheimer's therapeutics: continued clinical failures question the validity of the amyloid hypothesis-but what lies beyond? // Biochem. Pharmacol. 2013. Vol. 85. P. 289-305.
Myrick K.V., Huet F., Mohr S.E. et al. Large-scale functional annotation and expanded implementations of the P{wHy} hybrid transposon in the Drosophila melanogaster genome // Genetics. 2009. Vol. 182. P. 653-660.
Nagai Y., Fujikake N., Ohno K. et al. Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in Drosophila // Hum. Mol. Genet. 2003. Vol. 12. P. 1253-1259.
Nicholson L., Singh G.K., Osterwalder T. et al. Spatial and temporal control of gene expression in Drosophila using the inducible GeneSwitch GAL4 system. I. Screen for larval nervous system drivers // Genetics. 2008. Vol. 178. P. 215-234.
Olofsson A., Ippel H.J., Baranov V. et al. Capture of a dimeric intermediate during transthyretin amyloid formation // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 39592-39599.
Osterwalder T., Yoon K.S., White B.H. Keshishian H. A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4 // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98. P. 596-612.

Pandey U.B., Nichols C.D. Human disease models in Drosophila melanogaster and the role of the fly in therapeutic drug discovery // Pharmacol. Rev. 2011. Vol. 63. P. 411-436.
Pokrzywa M., Dacklin I., Hultmark D., Lundgren E. Misfolded transthyretin causes behavioral changes in a Drosophila model for transthyretin-associated amyloidosis // Eur. J. Neurosci, 2007. Vol. 26. P. 913-924.
Pokrzywa M., Dacklin I., Vestling M. et al. Uptake of aggregating transthyretin by fat body in a drosophila model for TTR-associated amyloidosis // PLoS One. 2010. Vol. 5. P. e14343.
Prusiner S.B. Prions // PNAS. 1998a. Vol. 95. P. 13363-13383.
Prusiner S.B. The prion diseases // Brain Pathol. 1998b. Vol. 8. P. 499-513.
Prusiner S.B., Hsiao K.K. Human prion diseases // Ann. Neurol. 1994. Vol. 35. P. 385-395.
Raeber A.J., Muramoto T., Kornberg T.B., Prusiner S.B. Expression and targeting of Syrian hamster prion protein induced by heat shock in transgenic Drosophila melanogaster // Mech. Dev. 1995. P. 317-327.
Reiter L.T., Potocki L., Chien S. et al. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in Drosophila melanogaster // Genome Res. 2001. Vol. 11. P. 1114–1125.
Rodríguez-Martínez A.B., Garrido J.M., Zarranz J.J. et al. A novel form of human disease with a protease-sensitive prion protein and heterozygosity methionine/valine at codon 129: Case report // BMC Neurol. 2010. Vol. 10. doi: 10.1186/1471-2377-10-99.
Roman G., Endo K., Zong L., Davis R.L. P[Switch], a system for spatial and temporal control of gene expression in Drosophila melanogaster // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98. P. 602-607.
Rørth P. A modular misexpression screen in Drosophila detecting tissue-specific phenotypes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. Vol. 93. P. 12418-12422.
Rosen D.R., Martin-Morris L., Luo L., White K.A. Drosophila gene encoding a protein resembling the human b-amyloid protein precursor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1989. Vol. 86. P. 2478-2482.
Sang T.K., Jackson G.R. Drosophila models of neurodegenerative disease // NeuroRx. 2005. Vol. 2. P. 438-446.
Sarantseva S., Timoshenko S., Bolshakova O. et al. Apolipoprotein E-mimetics inhibit neurodegeneration and restore cognitive functions in a transgenic Drosophila model of Alzheimer's disease // PLoS One. 2009a. Vol. 4. № 12. P. e8191.
Sarantseva S., Bolshakova O., Timoshenko S. et al. Overexpression of human amyloid precursor protein causes neurodegeneration and loss of synaptic proteins in transgenic Drosophila // New Trends in Alzheimer and Parkinson Disorders: ADPD. Eds. Hanin I., Fisher A. Prague: Czech Republic: Medimont, 2009b. P. 245-248.
Saura C., Choi S.-Y., Beglopoulos V. et al. Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration // Neuron. 2004. Vol. 42. P. 23-36.
Schwarzman A.L., Gregori L., Vitek M.P. et al. Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91. P. 8368-8372.
Schwarzman A.L., Singh N., Tsiper M. et al. Endogenous presenilin 1 redistributes to the lamellipodia upon adhesion of Jurkat cells to a collagen matrix // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. Vol. 96. P. 7932-7937.
Selkoe D.J. The cell biology of β-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease // Trends Cell. Biol. 1998. Vol. 8. P. 447-453.
Selkoe D.J. Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease // Nature. 1999. Vol. 399. P. 23-31.
Singh N., Tsiper M., Romanov V. et al. The role of Alzheimer's disease-related presenilin 1 in intercellular adhesion // Exp. Cell. Res. 2001. Vol. 263. P. 1-13.
Smith D., Wohlgemuth J., Calvi B.R. et al. Hobo enhancer trapping mutagenesis in *Drosophila* reveals an insertion specificity different from *P* elements // Genetics. 1993. Vol. 135. P. 1063-1076.
Staudt N., Molitor A., Somogyi K. et al. Gain-of-function screen for genes that affect Drosophila muscle pattern formation // PLoS Genet. 2005. Vol. 1. P. e55.
Tateishi J., Kitamoto T. Inherited prion diseases and transmission to rodents // Brain. Pathol. 1995. Vol. 5. P. 53-59.
Torroja L., Chu H., KotovskyI., White K. Neuronal overexpression of APPL, the Drosophila homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport // Curr. Biol. 1999a. Vol. 9. P. 489-492.
Torroja L., Packard M., Gorczyca M. et al. The Drosophila beta-amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction // J Neurosci. 1999b. Vol. 19. P. 7793-7803.
Van de Hoef D.L., Hughes J., Livne-Bar I. et al. Identifying genes that interact with Drosophila presenilin and amyloid precursor protein // Genesis. 2009. Vol. 47. P. 246-260.

Walsh D.M., Selkoe D.J. Deciphering the molecular basis of memory failure in Alzheimer's disease // Neuron. 2004. Vol. 44. P. 181-193.

Westermark P., Sletten K., Johansson B., Cornwell G.G. 3rd. Fibril in senile systemic amyloidosis is derived from normal transthyretin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. Vol. 87. P. 2843-2845.

Woeber K.A., Ingbar S.H. The contribution of thyroxinebinding prealbumin to the binding of thyroxine in human serum, as assessed by immunoadsorption // J. Clin. Invest. 1968. Vol. 47. P. 1710-1721.

Yagi Y., Tomita S., Nakamura M., Suzuki T. Overexpression of human amyloid precursor protein in Drosophila // Mol. Cell. Biol. Res. Commun. 2000. Vol. 4. P. 43-49.

Ye Y., FortiniM.E. Characterization of Drosophila presenilin and its colocalization with Notch during development // Mech. Dev. 1998. Vol. 79. P. 199–211.

Zhao X.L., Wang W.A., Tan J.X. et al. Expression of beta-amyloid induced age-dependent presynaptic and axonal changes in Drosophila // J. Neurosci. 2010. Vol. 20. P. 1512-1522.

Zou W.Q., Puoti G., Xiao X. et al. Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein // Ann. Neurol. 2010. Vol. 68. P. 162-172.

Молекулярно-генетическая модель таупатии на основе сверхэкспрессии протеинкиназы GSK3β в нервной системе *Drosophila melanogaster*

М.В. Тростников, Н.В. Рощина, А.В. Симоненко, Д.В. Муха, Е.Г. Пасюкова

Снижение смертности и продление здоровой человеческой жизни являются одним из приоритетных направлений работы в биологии и медицине. Известно, что старение сопряжено с развитием различных нейродегенеративных заболеваний, и следовательно предупреждение и лечение этих заболеваний, замедление старения и продление жизни могут быть связаны с коррекцией одних и тех же метаболических путей и вызваны вмешательством одних и тех же агентов.

Болезнь Альцгеймера является одним из наиболее распостраненных нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся деменцией, причем одним из основых ее призаков является гиперфосфорилирование и накопление белка тау в нейронах и клетках глии (Buerger et al., 2006; Ramachandran, Udgaonkar, 2013; Mal'tsev et al., 2013; Pooler et al., 2013). Таупатия возникает также при развитии другого нейродегенеративного заболевания – болезни Паркинсона, которая также сопровождается деменцией (Kawakami et al., 2013; Compta et al., 2013). Этот же диагностический признак характерен и для других, более редких болезней, сопровождающихся развитием слабоумия – болезни Пика, лобно-височной деменции, прогрессирующего надъядерного паралича, кортико-базальной дегенерации и некоторых других (Rowe et al., 2007; Noble et al., 2013; Pan, Chen, 2013). В настоящее время считается, что именно уровень фосфорилирования тау определяет развитие таупатий (Noble et al., 2013). Фосфорилирование белка тау обусловлено действием нескольких протеинкиназ, среди которых ключевую роль играет серин-треониновая протеинкиназа GSK-3 β (glycogensynthase kinase-3 β) (Noble et al., 2013). В связи с этим ингибирование GSK-3 β можно рассматривать как потенциальное средство борьбы с таупатиями (Rockenstein et al., 2007). Так, ингибирование GSK-3 β литием уже используется для лечения маниакального синдрома и некоторых других болезней (Rowe et al., 2007; Medina, Avila, 2014).

Протенкиназа GSK-3 β представляет собой мультифункциональный высококонсервативный белок, участвующий в регуляции сходных процессов у различных организмов, включая дрозофилу и человека. Взаимодействуя с Wnt-каскадом (Ataman et al., 2008; Chiang et al., 2009), GSK-3 β играет важную роль в развитии нервной системы, определяет активность синапсов, поведение, память. GSK-3 β связана также с функционированием инсулинового и TOR (Target of Rapamycin) каскадов – ключевых путей регуляции гомеостаза, метаболизма и старения (Kapahi et al., 2010). Интересно, что активация инсулинового и Wnt-каскадов снижает уровень фосфорилирования тау, опосредованный GSK-3 β (Medina, Avila, 2014). Избыточная акивность GSK-3 β в нервной системе приводит не только к гиперфосфорилированию тау, но также влияет на процессинг APP (Amyloid Precursor Protein) и

образование амилоидных пептидов, регулируя транскрипцию BACE1 (β-Secretase 1), изменяет свойства ионных каналов, вызывает нарушение функций митохондрий (Medina, Avila, 2014; Reddy, 2013). Существенную роль играет GSK-3 β в развитии различных других заболеваний – воспалений, диабета, ожирения (Reddy, 2013).

В последние годы для исследования молекулярно-генетических основ различных патологий и скрининга потенциальных лекарств всё большее использование находят модели болезней человека, созданные с использованием *Drosophila melanogaster* (Pandey, Nichols, 2011; Konsolaki, 2013). Высокий потенциал этих моделей обусловлен их высокой специфичностью, а также особенностями *Drosophila melanogaster* как объекта, пригодного для проведения умеренно массовых скринингов потенциальных лекарств (Rockenstein et al., 2007). Как модельный организм *Drosophila melanogaster* имеет множество преимуществ. В ее геноме, меньшем, но в то же время сравнимом по размеру с геномом человека, около 70% генов являются ортологами генов человека, а многие клеточные и физиологические процессы сходны на молекулярном уровне. Для *Drosophila melanogaster* разработан наиболее изощренный по сравнению с другими модельными организмами генетический инструментарий. В распоряжении исследователей находятся мутации практически всех генов, работа около 80% генов может быть заблокирована с помощью РНК-интерференции, усилена или ослаблена в целой мухе и в отдельном органе или ткани благодаря использованию специальных коллекций линий (http://flybase.org/). Сравнительно короткие жизненный цикл и продолжительность жизни *Drosophila melanogaster* позволяют эффективно проводить эксперименты, требующие большого числа поколений, и многократно проводить опыты большого масштаба, необходимые для получения достоверных результатов; проведение таких опытов с млекопитающими имеет ряд технических и финансовых ограничений.

В настоящее время у *Drosophila melanogaster* описано более 30 моделей различных болезней человека. Наибольший успех достигнут в создании моделей различных нейродегенеративных заболеваний (см. обзоры Cauchi, Van den Heuvel, 2006; Lu, Vogel, 2009; Jeibmann, Paulus, 2009), что обусловлено принципиальным сходством в развитии и структуре нейронов и системах передачи нервного импульса у *Drosophila melanogaster* и человека, а также возможностью адекватной оценки изменений в поведении и долгосрочной и краткосрочной памяти. Разработаны также модели различных онкологических заболеваний (Froldi et al., 2008; Palomero et al., 2008; Read et al., 2009), болезней сердечной мышцы (Wolf et al., 2006; Xu et al., 2006; Shcherbata et al., 2007; Taghli-Lamallem et al., 2008), инфекционных поражений (Nehme et al., 2007; Sibley et al., 2008; Dionne, Schneider, 2008), астмы (Roeder et al., 2009) и других болезней.

Таупатии были успешно смоделированы у *Drosophila melanogaster* с помощью сверхэкспрессии у мух гена белка тау быка, нормального и мутантного гена человека и гена *Drosophila melanogaster* (Williams et al., 2000; Wittmann et al., 2001; Jackson et al., 2002; Mershin et al., 2004). Эти модели хорошо воспроизводят основные черты таупатий человека: гиперфосфорилирование белка тау и его накопление, образование нейрофибриллярных клубков, нейродегенерацию, нарушение функции синапсов, сокращение продолжительности жизни. Различные модели от-

личаются не только происхождением сверхэкспрессированного гена, но и тканью, где индуцировали сверхэкспрессию: весь организм, все клетки мозга, мотонейроны или другие отдельные группы нервных клеток и др. Эффект сверхэкспрессии гена тау усиливался, если одновременно в клетках сверхэкспрессировали ген белка GSK-3 β и уменьшался при использовании ингибиторов протеинкиназы (Mudher et al., 2004; Yeh et al., 2010). Сверэкспрессия генов тау в клетках ретины приводила к появлению фенотипа грубых глаз (Chen et al., 2007). Сверхэкспрессия гена белка тау человека в мотонейронах *Drosophila melanogaster* нарушала подвижность мух (Jackson et al., 2002; Mudher et al., 2004). Сверэкспрессия генов тау в дорзальной части мезоторакса приводила к потере щетинок (Yeh et al., 2010). Видно, что помимо нарушений структуры и функции мозга таупатия у *Drosophila melanogaster* характеризуется различными нарушениями фенотипа, которые могут служить диагностическими признаками для оценки токсичности тау в скринингах потенциальных лекарств.

Создание лекарственных средств нового поколения, базирующееся на понимании механизмов болезни и научно обоснованных способов вмешательства в них, все шире распространяется за рубежом и начинает развиваться в нашей стране. Специфичность и направленность действия лекарства имеет принципиальное значение при лечении заболевания. Поиск терапевтических агентов и их мишеней, которые специфично взаимодействуют между собой, представляет собой сложную и актуальную задачу. Эффективное решение этой задачи становится возможным в результате разработки методов высокопродуктивного, чувствительного, быстрого и дешевого скрининга лекарственных препаратов. В основе такого скрининга лежит использование модельных систем различных заболеваний, позволяющих тестировать и отбирать препараты, обладающие заданной специфичностью в отношении конкретной патологии и даже конкретного механизма, вызывающего эту патологию. Использование модельных систем, позволяющих вести скрининг *in vivo*, является необходимым этапом поиска лекарств. В связи с этим разработка таких модельных систем представляет собой важную и актуальную задачу.

Преимущества поиска лекарственных средств с использованием *Drosophila melanogaster* основаны на следующем. 1) Возможность создания адекватных и гибких моделей болезней человека. 2) Возможность исследовать эффекты потенциальных лекарств на уровне целого организма и органов, свойства которых не удается воспроизвести у бактерий, дрожжей и на культуре клеток млекопитающих. 3) Простота и относительно малая стоимость содержания *Drosophila melanogaster*, короткий жизненный цикл. 4) Наличие технического оснащения для анализа диагностических признаков. Два последних пункта обусловливают возможность проведения умеренно массовых скринингов (Rockenstein et al., 2007). Первые попытки скринирования библиотек химических веществ с помощью моделей успешно осуществлены (Agrawal et al., 2005; Lai et al., 2008).

Целью нашей работы является создание молекулярно-генетической модели таупатии на основе трансгенных конструкций, обеспечивающих сверхэкспрессию различных форм протеинкиназы GSK-3 β в нервной системе *Drosophila melanogaster*. Эта модель может быть использована как инструмент для решения

фундаментальных задач – исследования молекулярно-генетических основ функционирования нервной системы в норме и патологии и контроля продолжительности жизни. Она дополнит ряд уже существующих моделей и позволит детально исследовать роль GSK-3 β в этих процессах. Такая задача представляется чрезвычайно важной, поскольку стало очевидно, что эта роль сложна и многообразна (Sofola et al., 2010; Reddy, 2013; Medina, Avila, 2014), а взаимосвязь различных процессов, в которых участвует GSK-3 β, и молекулярные механизмы их сопряжения остаются неясными.

Созданная модель таупатии также может быть адаптирована для практического использования в качестве тест-системы для скрининга потенциальных лекарственных препаратов. Использование такой модели позволит повысить специфичность скрининга и последующей терапии в отношении биомишеней, вызвающих гиперфосфорилирование тау.

Для осуществления поставленной цели в 2012–2014 гг. была заложена основа создаваемой модели: клонирована кДНК, соответствующая различным вариантам транскриптов гена *shaggy*, кодирующего GSK-3 β, получены линии-трансформанты, необходимые для обеспечения сверхэкспрессии различных вариантов протеинкиназы GSK-3 β и гиперфосфорилирования белка тау в клетках мозга, предварительно охарактеризована экспрессия GSK-3 β, подвижность, продолжительность жизни и функция синапсов у модельных особей.

В соответствии с принципиальной схемой модели гиперфосфорилирование тау достигается в результате увеличения уровня экспрессии GSK-3 β в нервной системе. Усиление экспрессии GSK-3 β достигается вследствие присутствия в геноме модельных мух дополнительной копии гена, кодирующего эту протеинкиназу, в составе специальной векторной конструкции. Экспрессия дополнительной копии гена (трансгена) обеспечивается благодаря использованию бинарной экспрессионной системы GAL4-UAS. Векторная конструкция помимо трансгена содержит дрожжевую последовательность UAS, активация которой с помощью специфического дрожжевого транскрипционного фактора GAL4 позволяет индуцировать экспрессию трансгена. Для активации экспрессии векторные конструкции (одна из них содержит дополнительную копию гена и UAS, а другая ДНК транскрипционного фактора GAL4 под управлением специфического промотора, обеспечивающего экспрессию в выбранной ткани) совмещаются в одном геноме в результате скрещивания.

Ген *shaggy*, кодирующий GSK-3 β дрозофилы, образует 17 различных транскриптов, которым соответствуют 11 форм белка (http://flybase.org). Для дальнейшего исследования было выбрано четыре транскрипта (рис. 1), существование которых было не только предсказано, но и продемонстрировано экспериментально (http://flybase.org). Транскрипт RB (длина несплайсированной формы 2847 п.н., сплайсированной – 1545 п.н.) кодирует основную форму белка, PB. Функциональная роль этой формы белка описана в ряде работ (Bourouis, 2002; Ataman et al., 2008; Chiang et al., 2009). Транскрипт RA (длина несплайсированной формы 2929 п.н., сплайсированной – 1728 п.н.) кодирует форму белка PA. Транскрипт RG (длина несплайсированной формы 3174 п.н., сплайсированной – 1491 п.н.) кодирует форму белка

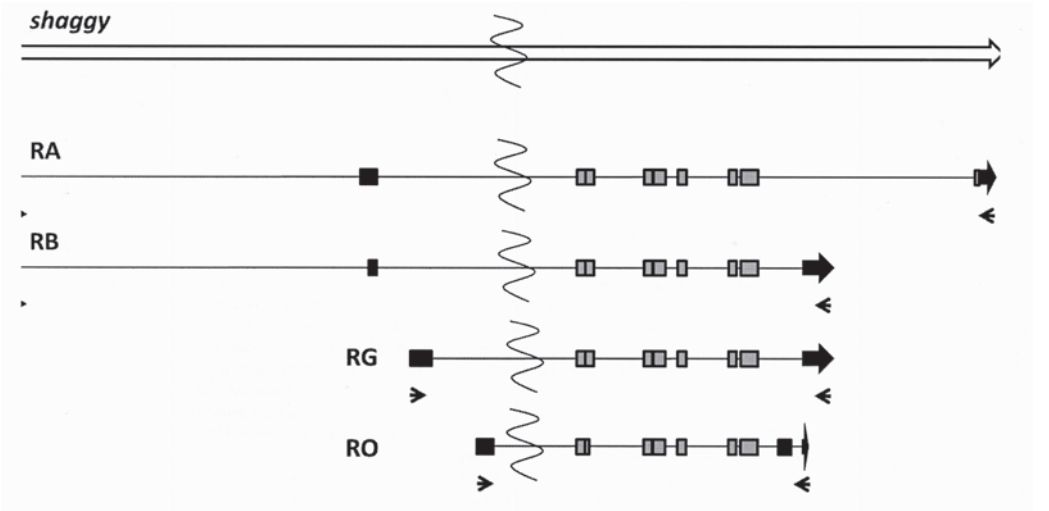


Рис. 1. Транскрипты гена *shaggy*

Интроны обозначены прямыми линиями, нетранслируемые области – черными прямоугольникам, транслируемые области – серыми прямоугольниками; стрелки обозначают позиции праймеров, использованных для получения к ДНК

PG. Транскрипт RO (длина несплайсированной формы 2166 п.н., сплайсированной – 1326 п.н.) кодирует форму белка PO. Функциональная роль этих форм белка неизвестна.

Анализ базы данных http://flybase.org показал, что линии, содержащие инсерцию векторной конструкции, в состав которой входит кДНК, соответствующая нормальному варианту основной формы белка GSK-3 β, PB, а также вариантам с аминокислотными заменами в N-терминальном ингибирующем сайте, активационной петле и киназном домене (Bourouis, 2002), имеются в центре культур дрозофилы (Блюмингтон, США). Эти линии были выписаны, получены и две из них подготовлены для дальнейшей работы. Одна из линий, *w(1118)*; *P{w(+mC)=UAS-sgg.B}MB5*, содержит инсерцию векторной конструкции, в состав которой входит кДНК, соответствующая нормальному белку PB, и последовательность индуцибельного дрожжевого промотора UAS (Bourouis, 2002). Вторая линия, *w(1118)*; *P{w(+mC)=UAS-sgg.Y214F}2*, содержит инсерцию векторной конструкции, в состав которой входит кДНК, соответствующая белку PB с аминокислотной заменой Y214F в активационной петле, и последовательность дрожжевого промотора UAS. В результате мутации экспрессия трансгенной копии GSK-3 β снижена примерно в 20 раз (Bourouis, 2002). Таким образом, использование этих двух линий дает возможность сильного и умеренного индуцированного увеличения активности GSK-3 β.

Получение линий дрозофилы, содержащих инсерции векторных конструкций, в состав которых входит кДНК, соответствующая формам белка PA, PG и PO, было проведено нами. Тотальная РНК была выделена из целых мух, самцов и самок, линии, использованной ранее для полногеномного секвенирования (http://flybase.org). Геном именно этой линии аннотирован в базе данных, из которой были по-

лучены сведения о транскриптах и белках, кодируемых геном *shaggy*. Выделенная РНК была использована для получения кДНК. С помощью специфических праймеров (см. рис. 1) фрагменты кДНК, соответствующие сплайсированным формам RA, RG и RO, были амплифицированы и клонированы в плазмидном векторе pUC19. Было проведено секвенирование полученных вставок, с тем чтобы выявить клоны, в которых последовательность ДНК не имела возникших в ходе амплификации нуклеотидных замен по сравнению с референсной последовательностью из базы данных. Один такой клон из трех секвенированных был выявлен для RA, один из трех секвенированных – для RG, и один из шести секвенированных – для RO. Эти три клона были далее использованы для переклонирования в вектор для эмбриональной трансформации дрозофилы pBI-UASC.

Для переклонирования в вектор для эмбриональной трансформации дрозофилы pBI-UASC (http://www.columbia.edu/cu/mccabelab/Publications/Vectors) (рис. 2) вставки ДНК, соответствующие RA, RG и RO, были амплифицированы таким образом, что к их 5' концу в положении, предшествующем стартовому кодону, была пришита последовательность Kozak CAAA, характерная для дрозофилы, для обеспечения лучшей экспрессии. Кроме того, к обоим концам были пришиты после-

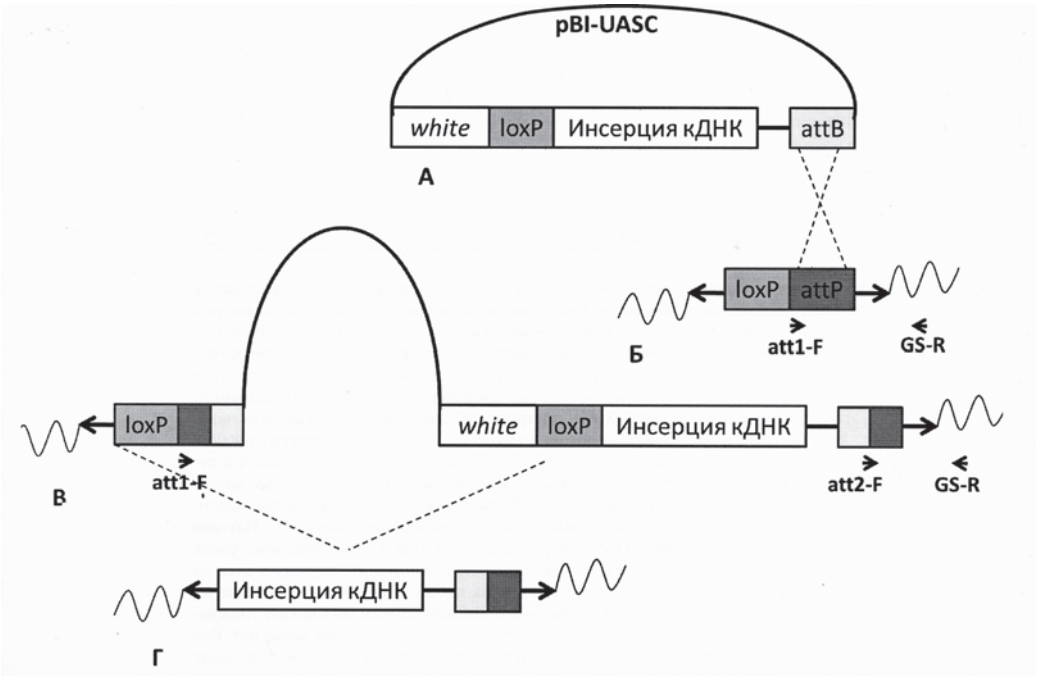


Рис. 2. Схема встраивания трансгенной конструкции в геном *Drosophila melanogaster*
А – плазмида с кДНК копией гена *shaggy*. Б – посадочный сайт для интеграции в геном. В – полный вектор, интегрированный в геном. Г – вектор, интегрированный в геном, после вырезания вспомогательных последовательностей. *white* – ген-маркер эмбриональной трансформации; attBи attP – последовательности сайт-специфической интеграции фага *PhiC31*; loxP – мишени для рекомбиназы фага *P1*; стрелки обозначают позиции праймеров (объяснения см. в тексте)

довательности, обеспечивающие клонирование в вектор pBI-UASC по выбранным сайтам рестрикции. Последовательность полученных в результате переклонирования вставок была проверена секвенированием. Полученные конструкции были далее использованы для получения линий-трансформантов.

Для эмбриональной трансформации дрозофилы была использована интеграционная система на основе фага *PhiC31*. Вектор pBI-UASC содержит attB-сайт, обеспечивающий сайт-специфическую интеграцию чужеродного генетического материала в районы хромосом дрозофилы с заранее интегрированым attP-сайтом (см. рис. 2). Интеграза фага осуществляет рекомбинацию между att-сайтами и обеспечивает встройку. Для трансформации была выбрана линия *y(1) M{vas-int. Dm}ZH-2A w(*); M{3xP3-RFP.attP'}ZH-51C*, которая содержит встроенную векторную конструкцию, кодирующую интегразу, встроенную векторную конструкцию с attP-сайтом, и характеризуется высокой эффективностью трансформации и отсутствием влияния геномных последовательностей на уровень экспрессии трансгена. Для каждой формы белка GSK-3 β (PA, PG и PO) было отобрано по несколько мух-трансформантов, из которых были заложены линии. Правильность встройки конструкции в каждой линии была подтверждена с помощью амплификации фрагмента ДНК с праймеров, один из которых гомологичен геномному окружению (GS-R), а второй – встроенной последовательности (att1-F, см. рис. 2). Далее, индукция рекомбинации по встроенным в трансгенные конструкции loxP-сайтам позволила вырезать из генома большую часть вспомогательных последовательностей, оставив в составе хромосом только трансгены (см. рис. 2). Эффективность вырезания была проверена с помощью ПЦР с праймерами att1-F, att2-F и GS-R (см. рис. 2). Для дальнейшей работы были выбраны три линии: *y(1) M{vas-int.Dm}ZH-2A w(*); M{3xP3-RFP.attP'}ZH-51C P{w(+mC)=UAS-sgg.A}1M* – содержит трансген, соответствующий форме *PA; y(1) M{vas-int.Dm}ZH-2A w(*); M{3xP3-RFP.attP'}ZH-51C P{w(+mC)=UAS-sgg.G}1M* – содержит трансген, соответствующий форме *PG, y(1) M{vas-int.Dm}ZH-2A w(*); M{3xP3-RFP.attP'}ZH-51C P{w(+mC)=UAS-sgg.O}1M* – содержит трансген, соответствующий форме PO.

Для создания модели был также сформирован набор специальных линий (драйверов), полученных из коллекционного центра в Блюмингтоне (США), в которых встроенные векторные конструкции содержат последовательности, кодирующие дрожжевой транскрипционный фактор GAL4 под управлением специфических промоторов, обуславливающих экспрессию в нервной системе. Линии *w*; P{GAL4-elav.L}3 и P{w(+mW.hs)=GawB}elav(C155) w(1118); P{w(+mC)=UAS-Dcr-2.D}2* обуславливают экспрессию в нервной системе в течение всей жизни. Линия *w*; P{GawB}D42* обуславливает экспрессию в мотонейронах. Линия w^{1118}*; P{Ddc-GAL4.L}4.36* обуславливает экспрессию в дофаминэргических и серотонинэргических нейронах. Линия *w(1118); P{GawB}DJ847* обуславливает уменьшающуюся с возрастом экспрессию в клетках нервной системы. Линия *w(1118); P{GawB}DJ651* обуславливает увеличивающуюся с возрастом экспрессию в клетках нервной системы.

Таким образом, в результате проведенной работы появилась возможность увеличивать уровень экспрессии четырех различных форм GSK-3 β (PA, PB, PG и PO)

в нервной системе модельных особей, совмещающих в своем геноме дополнительную копию определенного варианта гена *shaggy* (трансген) и специфический для нервной системы драйвер. Следующий этап работы заключался в характеристике модельных особей. Такая характеристика включала формальный этап – подтверждение того, что у модельных особей действительно увеличено количество транскрипта, соответствующего определенной форме GSK-3 β, и содержательный этап – подтверждение того, что модельные особи имеют фенотипические изменения, позволяющие судить о наличии у них признаков таупатии: а) появление агрегированного (гиперфосфорилированного) тау; б) нарушение функции синапсов; в) изменение поведения и памяти; г) изменение подвижности; д) изменение продолжительности жизни. Далее будут представлены предварительные характеристики модельных особей с генотипами *w(1118)/P{w(+mW.hs)=GawB}elav(C155) w(1118); +/P{w(+mC)=UAS-Dcr-2.D}2; P{w(+mC)=UAS-sgg.B}MB5/+, и w(1118)/P{w(+mW.hs)=GawB}elav(C155) w(1118); +/P{w(+mC)=UAS-Dcr-2.D}2; P{w(+mC)=UAS-sgg.Y214F}2/+*, у которых сильно и умеренно увеличена экспрессия основной формы GSK-3 β, PB, в клетках нервной системы на протяжении всей жизни, по сравнению с контрольными особями с генотипом *w(1118)/P{w(+mW.hs)=GawB}elav(C155) w(1118); +/P{w(+mC)=UAS-Dcr-2.D}2; +/+*.

Для того чтобы понять, действительно ли индукция трансгена приводит к сверхэкспрессии основной формы GSK-3 β, необходимо было измерить количество транскрипта, соответствующего форме RB, после индукции. Из самцов и самок модельных и контрольного генотипов на стадии личинки третьего возраста и на стадии имаго в возрасте 1–3 дней была выделена РНК, получена кДНК, и количество транскрипта RB было измерено с помощью ПЦР в реальном времени. Для амплификации были использованы праймеры, специфичные для данной формы транскрипта. И у личинок, и у взрослых мух обоего пола количество транскрипта RB у особей двух модельных генотипов превышало его количество у контрольных особей (рис. 3 иллюстрирует этот факт на примере личинок самцов и самок модельного генотипа со сверхэкспрессией нормальной основной формы GSK-3 β). Таким образом, на уровне транскрипта у модельных особей действительно наблюдается увеличенная экспрессия гена *shaggy*, кодирующего GSK-3 β. Следует отметить, что увеличение количества транскрипта сходно у особей двух модельных генотипов; этот результат ожидаем, поскольку экспрессия трансгена в обоих случаях находится под регуляцией одной и той же промоторной последовательности UAS. Мы предполагаем, что количество и суммарная активность белка GSK-3 β PB у особей двух модельных генотипов также увеличены, хотя и в разной степени, что обусловлено свойствами трансгенов, несущих нормальную и мутантную последовательности гена *shaggy*. Это предположение нуждается в дальнейшей экспериментальной проверке.

Для характеристики функционального состояния синапсов было проанализировано распределение и количество флюоресцентно-меченого маркера активных синаптических зон, белка Bruchpoint (Matkovic et al., 2013) в синаптических окончаниях в районе четвертого мышечного сегмента личинок III возраста. Сверхэкспрессия нормальной основной формы GSK-3 β привела к существенному уменьше-



Рис. 3. Количество транскрипта RB у личинок со сверхэкспрессией нормальной основной формы GSK-3β в нервной системе

Диаграмма построена с помощью программного обеспечения, поставляемого с детектирующим амплификатором MiniOpticon (Bio-Rad)

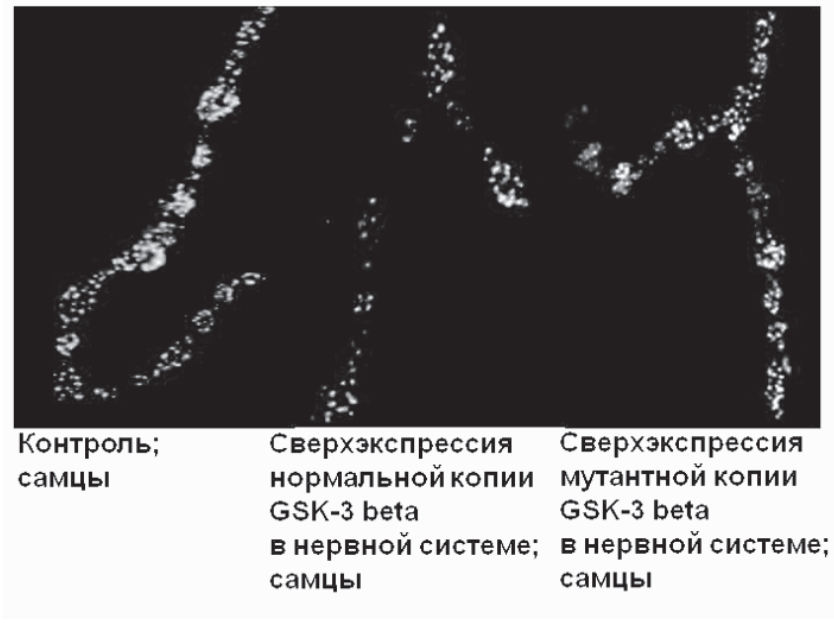


Рис. 4. Активность синапсов у личинок со сверхэкспрессией нормальной и мутантной основной формы GSK-3 β в нервной системе

Иммуногистохимическое окрашивание на белок Bruchpoint (красный)

нию количества активных зон как у самок, так и у самцов (рис. 4), что указывает на нарушение функции синапсов. Сверхэкспрессия мутантной основной формы GSK-3 β привела к менее выраженным эффектам (см. рис. 4). Исследование влияния сверхэкспресии различных вариантов GSK-3 β на функции нервной системы будет продолжено. Мы планируем охарактеризовать функциональное состояние синапсов в мозге (атенальных долях и грибовидных телах, где присутствуют скопления синапсов) самцов и самок разного возраста; наличие агрегированного (гиперфосфорилированного) тау; уровень нейродегенерации; изменение поведения и памяти у мух модельных генотипов.

У самцов и самок, экспрессирующих основную форму GSK-3 β в нервной системе на протяжении всей жизни, была охарактеризована продолжительность жизни и подвижность. Метод измерения продолжительности жизни описан в (Krementsova et al., 2012). Для измерения подвижности был использован специальный прибор фирмы TriKinetiks (США). Метод измерения основан на том, что интенсивность передвижения мух в тестерной пробирке оценивается по числу пересечений ими инфракрасных лучей, которое фиксируется компьютером с помощью специальной программы.

Сверхэкспрессия нормальной основной формы GSK-3 β драматически снизила продолжительность жизни и подвижность как самцов, так и самок. Самцы оказались практически неспособными вылезать из куколок и гибли. Если их удавалось вытащить, они оказывались жизнеспособными, однако медианная продолжительность их жизни составила 2 дня, а максимальная не превышала 4 дней, при медианной продолжительности жизни контрольных самцов 74 дня и максимальной – 92 дня. Медианная продолжительность жизни модельных самок составила 4 дня, а максимальная – 22 дня (77 и 96 дней у контрольных самок). Подвижность таких самцов и самок была нарушена настолько, что плохо детектировалась прибором. Сверхэкспрессия мутантной основной формы GSK-3 β снизила продолжительность жизни самцов (медианная продолжительность жизни – 42 дня, максимальная – 74 дня) и практически не изменила продолжительность жизни самок (медианная продолжительность жизни – 71 день, максимальная – 84 дня). Подвижность самцов и самок не отличалась от нормальной. Таким образом, степень изменения продолжительности жизни определяется как трансгеном, так и полом особей. Предполагаемое сильное увеличение активности GSK-3 β существенно уменьшает продолжительность жизни, в то время как предполагаемое умеренное увеличение активности GSK-3 β уменьшает продолжительность жизни в меньшей степени. И в том, и в другом случае более сильная реакция наблюдается у самцов.

Таким образом, первые данные о свойствах модельных особей позволяют предположить, что на их основе может быть успешно создана модель таупатии. Различные варианты модели позволяют исследовать различные характеристики таупатии. Так, у модельных особей со сверхэкспрессий мутантной основной формы GSK-3 β, характеризующихся нормальной жизнеспособностью и продолжительностью жизни, можно исследовать зависимые от возраста поведение и память мух. Модель, основанная на сверхэкспрессии нормальной основной формы GSK-3 β, характеризующаяся более выраженными эффектами в отношении синаптической функции,

может быть использована для дальнейшего изучения патологических изменений нервной системы. Мы также предполагаем провести исследование *Drosophila melanogaster* со сверхэкспрессией других форм GSK-3 β. Такой подход позволит всесторонне оценить роль GSK-3 β в контроле продолжительности жизни и функции нервной системы, включая поведение и память, выявить молекулярные основы взаимосвязи между этими признаками в норме и патологии.

Литература

Agrawal N., Pallos J., Slepko N. et al. Identification of combinatorial drug regiments for treatment of Huntington's disease using *Drosophila* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. Vol. 102. P. 3777-3781.

Ataman B., Ashley J., Gorczyca M. et al. Rapid activity-dependent modifications in synaptic structure and function require bidirectional Wnt signaling // Neuron. 2008. Vol. 57. P. 705-718.

Bourouis M. Targeted increase in *shaggy* activity levels blocks Wingless signaling // Genesis. 2002. Vol. 34. P. 99-102.

*Buerger K., Ewers M., Pirttilä T., et al.*CSF phosphorylated tau protein correlates with neocortical neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease // Brain. 2006. Vol. 129. Pt. 11. P. 3035-3041.

Cauchi R.J., van den Heuvel M. The fly as a model of neurodegenerative diseases: is it worth the jump? // Neurodegenerative Dis. 2006. Vol. 3. P. 338-356.

Chen X., Li Y., Huang J. et al. Study of tauopathies by comparing *Drosophila* and human tau in *Drosophila* // Cell. Tissue Res. 2007. Vol. 329. P. 169-178.

Chiang A., Priya R., Ramaswami M., et al. Neuronal activity and Wnt signaling act through Gsk3-β to regulate axonal integrity in mature *Drosophila* olfactory sensory neurons // Development. 2009. V. 136. P. 1273-1282.

Compta Y., Parkkinen L., Kempster P. et al. The significance of α-synuclein, amyloid-β and tau pathologies in Parkinson's disease progression and related dementia // Neurodegener. Dis. 2013.doi: 10.1159/000354670.

Dionne V.S., Schneider D.S. Models of infectious diseases in the fruit fly *Drosophila melanogaster* // Disease Models Mech. 2008. Vol. 1. P. 43-49.

Froldi F., Ziosi M., Tomba G. et al. Drosophila Lethal Giant Larvae neoplastic mutant as a genetic tool for cancer modeling // Current Genomics. 2008. Vol. 9. P. 147-154.

Jackson G.R., Wiedau-Pazos M., Sang T. K. et al. Human wild-type tau interacts with wingless pathway components and produces neurofibrillary pathology in *Drosophila* // Neuron. 2002. Vol. 34. P. 509-519.

Jeibmann A., Paulus W. Drosophila melanogaster as a model organism of brain diseases // Int. J. Mol. Sci. 2009. Vol. 10. P. 407-440.

Kapahi P., Chen D., Rogers A.N. et al. With TOR, less is more: a key role for the conserved nutrient-sensing TOR pathway in aging // Cell Metab. 2010. Vol. 11. P. 453-465.

Kawakami F., Shimada N., Ohta E. et al. LRRK2 regulates tau phosphorylation through direct activation of GSK-3β // FEBS J. 2013. doi: 10.1111/febs.12579.

Konsolaki M. Fruitful research: drug target discovery for neurodegenerative diseases in *Drosophila* // Expert. Opin.Drug Discov. 2013. Vol. 8. P. 1503-1513.

Krementsova A.V., Roshina N. V., Tsybul'ko E.A. et al. Reproducible effects of the mitochondria-targeted plastoquinone derivative SkQ1 on *Drosophila melanogaster* lifespan under different experimental scenarios // Biogerontology. 2012. Vol. 13. P. 595–607.

Lai T. S., Liu Y., Tucker T. et al. Identification of chemical inhibitors to human tissue transglutaminase by screening existing drug libraries // Chem. Biol. 2008. Vol. 15. P. 969-978.

Lu B., Vogel H. Drosophila models of neurodegenerative diseases // Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis. 2009. Vol. 4. P. 315-342.

Mal'tsev A.V.,Davidchenko N.V., Uteshev V.K. et al. Intensive protein synthesis in neurons and phosphorylation of beta-amyloid precursor protein and tau-protein are triggering factors of neuronal amyloidosis and

Alzheimer's disease // Biomed. Khim. 2013. Vol. 59. P. 144-170.
Matkovic T., Siebert M., Knoche E. et al. The Bruchpilot cytomatrix determines the size of the readily releasable pool of synaptic vesicles // J. Cell Biol. 2013. Vol. 202.P. 667-683.
Medina M., Avila J. New insights into the role of glycogen synthase kinase-3 in Alzheimer's disease // Expert Opin. Ther. Targets. 2014. Vol. 18. P. 69-77.
Mershin A.,Pavlopoulos E., Fitch O. et al. Learning and memory deficits upon TAU accumulation in *Drosophila* mushroom body neurons // Learn. Mem. 2004. Vol. 11. P. 277-287.
Mudher A., Shepherd D., Newman T.A. et al. GSK-3beta inhibition reverses axonal transport defects and behavioural phenotypes in *Drosophila* // Mol. Psychiatry. 2004. Vol. 9. P. 522-530.
Nehme N.T.,Lie´geois S., Kele B. et al. A model of bacterial intestinal infections in *Drosophila melanogaster* // PLoS Pathol. 2007. Vol. 3. P. e173.
Noble W., Hanger D. P., Miller C. C., Lovestone S. The importance of tau phosphorylation for neurodegenerative diseases // Front. Neurol. 2013. Vol. 4. P. 83.
Palomero T., Dominguez M., Ferrando A.A. The role of the PTEN/AKT pathway in NOTCH1-induced leukemia // Cell Cycle. 2008. Vol. 7. P. 965-970.
Pan X.D., Chen X.C. Clinic, neuropathology and molecular genetics of frontotemporal dementia: a mini-review // Transl. Neurodegener. 2013. Vol. 2. P. 8-14.
Pandey U.B., Nichols C.D. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery // Pharmacol. Rev. 2011. Vol. 63. P. 411-436.
Pooler A.M.,Polydoro M., Wegmann S. et al. Propagation of tau pathology in Alzheimer's disease: identification of novel therapeutic targets // Alzheimers Res. Ther. 2013. Vol. 5. P. 49-61.
Ramachandran G., Udgaonkar J.B. Mechanistic studies unravel the complexity inherent in tau aggregation leading to Alzheimer's disease and the tauopathies // Biochemistry. 2013. V.52. P. 4107-4126.
Read R.D., Cavenee W.K., Furnari F.B., Thomas B.A. Drosophila model for EGFR-Ras and PI3K-dependent human glioma // PLoS Genet. 2009. Vol. 5. P. e1000374.
Reddy P.H. Amyloid beta-induced glycogen synthase kinase 3β phosphorylated VDAC1 in Alzheimer's disease: implications for synaptic dysfunction and neuronal damage // Biochim. Biophys. Acta. 2013. Vol. 1832. P. 1913-1921.
Rockenstein E., Crews L., Masliah E. Transgenic animal models of neurodegenerative diseases and their application to treatment development // Adv. Drug Deliv. Rev. 2007. Vol. 59. P. 1093-1102.
Roeder T.,Isermann K., Kabesch M. Drosophila in Asthma Research // Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 2009. Vol. 179. P. 979-983.
Rowe M.K.,Wiest C., Chuang D.M. GSK-3 is a viable potential target for therapeutic intervention in bipolar disorder // Neurosci. Biobehav. Rev. 2007. Vol. 31. P. 920-931.
Shcherbata H.R.,Yatsenko A.S., Patterson L. et al. Dissecting muscle and neuronal disorders in a Drosophila model of muscular dystrophy // EMBO J. 2007. V. 26. P. 481-493.
Sibley C.D., Duan K., Fischer C. et al. Discerning the complexity of communityinteractions using a *Drosophila* model of polymicrobial infections // PLoS Pathol. 2008. Vol. 4. P. e1000184.
Sofola O., Kerr F., Rogers I. et al. Inhibition of GSK-3 ameliorates Abeta pathology in an adult-onset *Drosophila* model of Alzheimer's disease // PLoS Genet. 2010. Vol. 6. P. e1001087.
Taghli-Lamallem O., Akasaka T., Hogg G. et al. Dystrophin deficiency in *Drosophila* reduces lifespan and causes a dilated cardiomyopathy phenotype // Aging Cell. 2008. Vol. 7. P. 237-249.
Williams D.W.,Tyrer M., Shepherd D. Tau and tau reporters disrupt central projections of sensory neurons in *Drosophila* // J. Comp. Neurol. 2000. V. 428. P. 630-640.
Wittmann C.W., Wszolek M.F., Shulman J.M. et al. Tauopathy in *Drosophila*: neurodegeneration without neurofibrillary tangles // Science. 2001. Vol. 293. P. 711-714.
Wolf M.J., Amrein H., Izatt J.A. et al. Drosophila as a model for the identification of genes causing adult human heart disease // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. Vol. 103. P. 1394-1399.
Xu Y., Condell M., Plesken H. et al. A *Drosophila* model of Barth syndrome // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. Vol. 103. P. 11584-11588.
Yeh P.A., Chien J.Y., Chou C.C. et al. Drosophila notal bristle as a novel assessment tool for pathogenic study of Tau toxicity and screening of therapeutic compounds // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. Vol. 391. P. 510-516.

Глава 3

НАУРШЕНИЕ СЕНСОРИКИ

Молекулярные механизмы нейродегенерации клеток сетчатки при ишемии

Г.Р. Каламкаров, А.Е. Бугрова,
Т.С. Константинова, Т.Ф. Шевченко

Уже в начале прошлого века один из первых лауреатов Нобелевской премии Рамон-и-Кахаль назвал сетчатку «мозгом, вынесенным на периферию». Он основывался на том, что гистологически устройство мозга и сетчатки оказалось удивительно похожим. Позже выяснилось, что не только структурно эти ткани похожи. В основе их функционирования лежат одинаковые молекулярные механизмы, химические посредники, способы регуляции синаптической передачи. В отличие от других сенсорных модальностей, в процессе зрительного восприятия обработка информации происходит уже в сетчатке глаза. У многих животных такие важнейшие функции, как определение направления и скорости движения объекта, полностью локализованы в сетчатке. Известно, что чем проще устроен мозг животного, тем сложнее устроена его сетчатка.

Такое сходство приводит к тому, что и многие молекулярные механизмы, связанные с гибелью нейронов, имеют одинаковый патогенез. В ряде случаев даже при отсутствии клинических признаков заболевания мозга в сетчатке наблюдаются одинаковые молекулярные проявления. Так, при болезни Альцгеймера, причиной (не исключено что и следствием) которой является накопление β-амилоида, β-амилоид обнаруживается и в сетчатке глаза.

Другим примером является рассеянный склероз. При этом заболевании, которое характеризуется, в частности, и нарушениями функции зрительного нерва, клинические проявления неврита зрительного нерва часто являются первым эпизодом заболевания. Причиной этого является глубокая морфологическая и функциональная связь мозга и сетчатки, когда аксоны ганглиозных клеток сетчатки и формируют зрительный нерв.

Среди заболеваний, патогенез и молекулярные механизмы которых в мозге и сетчатке сходны, особое место занимает ишемия. Термин «ишемия» означает снижение кровоснабжения ткани. Для ишемии всегда характерно состояние гипоксии (недостаток кислорода) или аноксии (полное его отсутствие). Гипоксия может

Сокращения: ВГД – внутриглазное давление; ВМД – возрастная макулярная дегенерация; ВЯС – внутренний ядерный слой; ГК – ганглиозные клетки; ДНК-Ж – динитрозильный комплекс железа с глутатионом; ДР – диабетическая ретинопатия; РН – ретинопатия недоношенных; СОД – супероксиддисмутаза; ЭРГ – электроретинограмма; ASICs – кислоточувствительные ионные каналы; NOS – NO-синтаза.

наблюдаться при снижении доступности кислорода или способности клеток его утилизировать, например, при снижении pO_2, снижении уровня гемоглобина, повреждении митохондриальных ферментов и т.д. При ишемии кроме недостаточного снабжения ткани кислородом наблюдается дефицит питательных веществ и накопление продуктов обмена. Ишемия всегда включает понятие гипоксии, однако при гипоксии далеко не всегда наблюдаются клинические признаки ишемии.

Целью настоящей работы явилась, с одной стороны, попытка проанализировать современные представления о молекулярных механизмах развития ишемии сетчатки и выявить их сходство с такими же процессами в мозге, с другой стороны – представить полученные нами данные о ключевой роли оксида азота как необходимого фактора в процессе развития ишемии в сетчатке.

Ретинальная ишемия сопровождает большинство офтальмологических заболеваний (Osborne et al., 2004; Stitt et al., 2011; Minhas et al., 2012). Ишемия сетчатки и зрительного нерва вовлечена в патогенез таких заболеваний, как окклюзии, или тромбоз ретинальных сосудов, возрастная макулярная дегенерация (ВМД), диабетическая ретинопатия (ДР), ретинопатия недоношенных (РН), глаукома (Bek, 2009). Однако, несмотря на многочисленные клинические и экспериментальные исследования, роль ретинальной ишемии в патогенезе этих заболеваний не до конца ясна. Ретинальная ишемия – клиническое состояние, при котором нарушается кровоснабжение сетчатки. Сетчатка является продолжением ЦНС и имеет много общих с мозгом эмбриологических, функциональных и анатомических признаков. Ответ на ишемию нейронов сетчатки сходен с ответом нейронов других частей ЦНС. Однако сетчатка более устойчива к ишемическому повреждению по сравнению с мозгом. Отсутствие эффективного лечения является основной причиной нарушения зрения и слепоты.

Среди молекулярных механизмов, лежащих в основе патогенеза ишемии – окислительный стресс, эксайтотоксичность, аутоиммунные и воспалительные реакции. Эти механизмы часто выступают единым фронтом, в той или иной степени проявляясь при различных заболеваниях (Sharma, 2007). С другой стороны, при патологических состояниях, в развитии которых определяющую роль играет ретинальная ишемия, в спектре ее молекулярных механизмов всегда присутствуют действующие в тандеме другие ключевые механизмы ретинальных дегенераций. Например, ишемия может вызывать метаболическую дисфункцию нейронов сетчатки, стимулировать эксайтотоксичность, окислительный стресс, а индуктором окислительного стресса может выступать эксайтотоксичность.

Сетчатка особенно чувствительна к патологическим состояниям, которые нарушают сбалансированное взаимодействие ее нейрональной и сосудистой сети, обеспечивающей жизнедеятельность ретинальных нейронов. Поэтому заболевания, первично поражающие нейральную сетчатку (например дегенерация фоторецепторов), сопровождаются аномалиями сети ретинальных сосудов. С другой стороны, патологические состояния, клинически характеризуемые альтерацией хориоидальной или ретинальной сосудистой сети, такие как ВМД, ДР и РН, поражают также нейроны сетчатки, то есть всегда связаны с широким спектром гипоксических ишемических нарушений нейральной ткани (Zacchigna et a., 2007; Fulton et al., 2009).

Метаболическая дисфункция нейронов при ишемии приводит к необратимым повреждениям ткани и сопровождается гибелью клеток вследствие апоптоза (Osborne et al., 2004; Stitt et al., 2011; Fulton et al., 2009).

При рассмотрении молекулярных механизмов ишемических повреждений следует различать две стадии процесса – ишемию и реперфузию. Ишемия вызывается непосредственно понижением концентрации кислорода в клетках; реперфузия определяет ответ клеток на первичные ишемические изменения и возникновение компенсаторных механизмов. Основными молекулярными механизмами, определяющими патологические изменения при ишемии–реперфузии, являются энергодефицит, изменения концентрации кальция, эксайтотоксичность, окислительный стресс. Все эти процессы, как в сетчатке в целом, так и в отдельных клетках, взаимосвязаны.

К ишемии восприимчивы все нейроны сетчатки, однако наиболее чувствительными считаются ганглиозные клетки (ГК) (Kergoat et al., 2006; Chen et al., 2007; Kaur et al., 2008).

Фоторецепторы – специализированные клетки, имеющие самую высокую потребность в кислороде из всех клеток тела (Steinberg, 1987). Однако фоторецепторы менее чувствительны к ишемии, чем ГК, и для большинства ассоциированных с ишемией заболеваний наиболее характерным признаком поражения нейральной сетчатки является гибель ганглиозных клеток и истончение слоя нервных волокон. Интересно отметить, что именно уникальные для сетчатки, в отличие от мозга, структуры, а именно – фоторецепторы, наименее чувствительны к ишемическим повреждениям. Одна из причин подобных различий состоит в разной системе кровоснабжения наружных и внутренних клеточных слоев сетчатки. Кровоснабжение фоторецепторов осуществляется со стороны хориоидеи, и, поскольку фоторецепторные клетки характеризуются большой длиной, возникает градиент pO_2 между базальным и апикальным полюсами клеток. Высокая плотность митохондрий во внутреннем сегменте в норме поддерживает относительно низкое pO_2. Это свидетельствует о том, что фоторецепторы, вероятно, используют некие компенсаторные механизмы для выживания при низком содержании кислорода в окружающей их микросреде (Schmidt et al., 2003). На чувствительность фоторецепторов к ишемии влияет уровень световой адаптации. Светоадаптированные рецепторы менее чувствительны к ишемии и эксайтотоксичности. Палочки более чувствительны к ишемии, чем колбочки, возможно, поскольку колбочки обладают более высокой кальциевой буферной емкостью (Sharma, 2007). Амакриновые клетки во внутренней сетчатке также чувствительны к ишемии и эксайтотоксичности. Ишемия повышает экспрессию провоспалительных медиаторов, таких как COX-2, TNF, NO, в амакриновых клетках (Ju et al., 2003). Эти молекулы вовлечены также в ишемическое повреждение ГК, что позволяет предполагать существование общих механизмов ишемического повреждения в различных классах нейронов (Singh et al., 2001). Ишемия дифференцированно поражает тела и аксоны нейронов (Petty, Wettstein, 1999). Это различие особенно важно для понимания патофизиологии глаукомы, где ключевые события могут развиваться в аксонах ГК скорее, чем в их клеточных телах.

При ишемии блокируется снабжение сетчатки кислородом и глюкозой, что нарушает энергетический метаболизм, приводя к снижению внутриклеточного уров-

ня АТФ. Это, в свою очередь, нарушает мембранный потенциал и ионный гомеостаз, запуская процессы, ведущие к гибели клеток. Одним из результатов снижения энергетического метаболизма является снижение активности Na^+/K^+ АТФ-азы, нарушающее регуляцию мембранного потенциала (Lipton, 1999).

Одним из проявлений снижения концентрации кислорода и соответствующих изменений энергообеспечения клетки при ишемии является ацидоз – закисление среды как вне клетки, так и внутри нее. Ацидоз играет важную роль в процессе ишемического повреждения ткани (Tombaugh, Sapolsky, 1993).

Молекулярные механизмы ацидоза идентифицированы, в основном, в экспериментах на мозге, однако предполагается, что эти механизмы являются общими для всех нервных тканей и, в частности, характерны для нейральной сетчатки. Закисление объясняется накоплением молочной кислоты, которое в условиях недостаточного снабжения кислородом вызвано переключением метаболизма с окислительного фосфорилирования на анаэробный гликолиз. Эффективность гликолитической генерации АТФ гораздо ниже аэробной, митохондриальной, поэтому процессы гидролиза АТФ начинают преобладать над синтезом этой молекулы, что способствует накоплению в клетке протонов. Интенсивный вывод протонов и лактата из клеток вызывает снижение pH вне клетки. Например, было показано, что через 10 минут тотальной ишемии мозга крысы внутриклеточный pH падал до 6,3, а содержание лактата увеличивалось в 10 раз (Shimizu et al., 1993).

Обсуждаются разные механизмы, объясняющие повреждающий эффект ацидоза при ишемии. Было показано, что при ацидозе ингибируется депонирование внутриклеточного кальция, что приводит к повышению концентрации Ca^{2+} в цитозоле (Siesjo et al., 1996). Повышение концентрации внутриклеточного кальция происходит в том числе и в результате активации кислото-чувствительных ионных каналов (ASICs). В норме в нервной ткани эти каналы, видимо, связаны с функционированием синапсов, вовлечены в процессы синаптической пластичности, обучения и памяти (Wemmie et al., 2002). Многочисленные эксперименты на нокаутных мышах и клеточных культурах с использованием блокаторов ASICs свидетельствуют о важной роли этих каналов в процессе ишемического повреждения нервной ткани (Chu, Xiong, 2012; Sherwood et al., 2011; Li et al., 2010). Еще одной причиной повреждения нейронов при ацидозе может быть усиление продукции свободных радикалов в клетке при низких значениях pH с вовлечением в этот процесс ионов железа (Musleh et al., 1994).

Большое количество экспериментальных данных свидетельствует о том, что избыток глутамата (явление эксайтотоксичности) приводит к гибели нервных клеток и является одним из основных проявлений ишемии (Louzada-Junior et al., 1992; Nucci et al., 2005; Russo et al., 2009). Эксайтотоксичность наблюдается при таких патологиях, как ДР, глаукома, окклюзия хориоидальных и ретинальных сосудов (Qu et al., 2010; Kowluru, Zhong, 2011; Li et al., 2012).

Гипотезу эксайтотоксической гибели нейронов впервые выдвинул Дж.В.Е. Олней (Olney, Farber, 1994). Глутамат – основной возбуждающий нейротрансмиттер в сетчатке. Он высвобождается фоторецепторами, биполярными клетками и ГК (Sharma, Ehinger, 2003). В норме освобожденный глутамат находится в синапти-

ческой щели очень короткое время (несколько миллисекунд), и концентрация его низка, поскольку нейроны и глия эффективно удаляют нейромедиаторы из синаптической щели после их выделения. Если уровень глутамата остается повышенным достаточно долго, это может привести возбужденные нейроны к гибели. При физиологических условиях глутамат поглощается глиальными клетками, преобразуется глутаминсинтазой в глутамин, который затем транспортируется назад к телам нейронов и там при участии глутаминазы превращается в глутамат (Thoreson, Witkovsky, 1999). Снижение внутриклеточной концентрации АТФ в глиальных клетках при ишемии приводит к инактивации глутаминсинтазы, которая в таких условиях может дополнительно инактивироваться вследствие повышения уровня свободных радикалов (Oliver et al., 1990). Метаболический баланс глутамата изменяется, и в результате сильно увеличивается соотношение глутамат/глутамин в глиальных клетках, что также может способствовать ускоренному выходу глутамата. Основная нагрузка по удалению избытка глутамата во внутренних слоях сетчатки приходится на клетки Мюллеровой глии (Pow et al., 2000). При ретинальной ишемии эффективность захвата глутамата этими клетками снижается (Barnett et al., 2001). Дисфункция переносчиков глутамата в клетках глии зачастую является ключевым событием каскада реакций, ведущих к эксайтотоксической гибели нейронов сетчатки (Russo et al., 2013; Holcombe et al., 2008). Кроме того, снижению захвата глутамата клетками глии способствует ацидоз, развивающийся при ишемии (Billups, Attwell, 1996), и генерируемые в нейронах активные формы кислорода (Rao et al., 2003).

Основной причиной токсического действия глутамата является увеличение внутриклеточной концентрации кальция. Активация AMPA, каинатных и NMDA-рецепторов приводит к притоку Na^+ в нейроны. Это, в свою очередь, усиливает деполяризацию, которая, среди других событий, активирует потенциал-зависимые Ca^{2+}-каналы, увеличивая входной ток Ca^{2+} (Lipton, 1999; Sivakumar et al., 2013). В исследованиях на мозге было показано, что внеклеточная концентрация глутамата при ишемии повышается в два этапа: сначала наблюдается непродолжительное Ca^{2+}-зависимое повышение, за которым следует длительное Ca^{2+}-независимое повышение (Wahl et al., 1994). На ранней стадии ишемии высвобождение глутамата увеличивается за счет активации потенциал-зависимых Ca^{2+}-каналов вследствие деполяризации мембраны, вызванной ишемией. Однако когда дефицит энергии достаточно длителен и внутриклеточный уровень АТФ становится слишком низким, чтобы обеспечивать высвобождение медиатора путем экзоцитоза, высвобождение глутамата становится Ca^{2+}-независимым в результате активации альтернативных механизмов его высвобождения (Nishizawa, 2001).

Специфическая восприимчивость к глутамату нейронов внутренних слоев сетчатки и ганглиозных клеток при ишемии является следствием того, что эти клетки содержат ионотропные глутаматные рецепторы в высокой концентрации (Brandstatter et al., 1994). Глутамат активирует эти рецепторы, вызывая избыточную деполяризацию и, в конечном счете, гибель клетки. Напротив, вызывающие гиперполяризацию тормозные медиаторы типа ГАМК ослабляют влияние глутамата, противодействуя деполяризации (Schwartz-Bloom, Sah, 2001). Таким образом,

повышение концентрации медиаторов, которые стимулируют тормозные рецепторы, защищает нейроны, содержащие эти рецепторы.

Глутамат также способствует образованию активных форм кислорода. На первых стадиях ишемии они возникают в результате нарушения кровоснабжения, а следовательно и снабжения кислородом и метаболическими субстратами. В дальнейшем, на стадии восстановления кровотока (реперфузии) и ожидаемого улучшения состояния ткани, патологический процесс продолжается вследствие так называемых реперфузионных повреждений, в которых участвуют свободные радикалы, образующиеся при повторном окислении накопленных при ишемии продуктов. Предполагают, что при значительном и достаточно быстром образовании свободных радикалов происходит подавление нормальных клеточных антиоксидантных защитных механизмов, вызывающее окислительный стресс и различные типы повреждения тканей (Gilgun Sherki et al., 2002).

Одним из участников повреждений при реперфузии является фермент ксантиноксидаза, который участвует в катаболизме пуринов, катализируя окисление гипоксантина в ксантин и его последующее окисление в мочевую кислоту. При этом в сопряженной реакции ксантиноксидаза восстанавливает кислород до супероксида, который спонтанно дисмутирует в пероксид водорода. Таким образом, в процессе этой реакции образуются активные формы кислорода, способные вызывать окислительный стресс. Так, при длительной ишемии в тканях накапливаются продукты распада пуринов, и при реперфузии, когда уровень кислорода восстанавливается, ксантиноксидаза продуцирует повышенное количество токсичных супероксида и пероксида водорода. В результате взаимодействия пероксида водорода и супероксида образуется очень токсичный гидроксильный радикал ($OH^{\bullet}$). Кроме того, O_2^- может взаимодействовать с оксидом азота (NO), который образуется в значительных количествах после ишемии, приводя к формированию пероксинитрита, нитрозильного радикала и, в конечном счете, $OH^{\bullet}$ (Chan, 1996; Gilgun Sherki et al., 2002). По крайней мере, некоторые амакриновые клетки сетчатки являются дофаминергическими (Sharma, Ehinger, 2003), и генерация активных форм кислорода во время окисления дофамина моноаминоксидазой в нервных окончаниях стимулирует развитие окислительного стресса.

Как известно, образование свободнорадикальных форм кислорода приводит к значительным повреждениям клеток нервной ткани в результате пероксидного окисления ненасыщенных жирных кислот клеточных мембран. При этом происходит как повреждение самих мембран (снижение их вязкости), так и образование вторичных пероксидных радикалов, которые могут индуцировать развитие ишемических и постишемических (при реперфузии) повреждений (Celebi et al., 2002).

Введение в глаз взрослой крысы NMDA вызывает дозозависимую потерю ГК и холинергических амакриновых клеток (Siliprandi et al., 1992; Osborne et al., 2004), подобную той, которая наблюдается при ишемии. С другой стороны, ишемическое повреждение сетчатки может быть обратимым при добавлении антагонистов NMDA и AMPA или каината (Osborne et al., 2004). До настоящего времени остается неясным, как взаимосвязаны процессы эксайтотоксичности и апоптотической гибели клеток при ишемии. Ишемия непосредственно запускает эксайтотоксическую

нейродегенерацию, и апоптотическая нейродегенерация может развиваться как ее последствие, поскольку оставшиеся нейроны (выжившие после эксайтотоксической дегенерации) лишены синаптических контактов, необходимых для их выживания (Young et al., 2004).

Ранее полагали, что ишемическая гибель клеток происходит исключительно путем классического некроза, поскольку его морфологическим критерием является набухание клеток. Гибель клеток внутренних слоев сетчатки при окклюзии центральной артерии сетчатки происходит и по пути апоптоза, и по пути некроза (Gaydar et al., 2011; Das et al., 2008; Dratviman-Storobinsky et al., 2008). Ретинальная ишемия, созданная повышением внутриглазного давления (ВГД), приводила к апоптотической гибели клеток, что было продемонстрировано гистологически, по фрагментации ДНК и в экспериментах с использованием ингибитора эндонуклеазы (Lam et al., 1995).

Известно, что ишемия сетчатки приводит к экспрессии каспазы-3 (Zhang et al., 2005, 2007), Bax, Bcl-x (Zhang et al., 2005; Produit-Zengaffinen et al., 2009), NF-kB (Wang et al., 2006), разных изоформ NO-синтазы (Nucci et al., 2005; Sennlaub et al., 2002; Kaur et al., 2008; Kim et al., 2012), и это лишь небольшая часть белков, участвующих в индукции апоптоза. Инактивация этих белков может предотвращать клеточную гибель при ретинальной ишемии, как, например, это было показано в экспериментах с использованием специфических ингибиторов каспаз. Это позволяет надеяться, что создание фармакологических средств, предотвращающих развитие апоптоза, может предотвратить дегенерацию клеток сетчатки при заболеваниях глаза, обусловленных ишемией.

Что касается апоптотической гибели клеток с участием NO-синтазы (NOS), а следовательно и NO, то повышение экспрессии нейрональной и индуцибельной NO-синтазы (nNOS и iNOS, соответственно) при ретинальной ишемии продемонстрировано на различных экспериментальных моделях (Nucci et al., 2005; Sennlaub et al., 2002; Kaur et al., 2008; Kim et al., 2012). При ишемии повышается внутриклеточная концентрация кальция, что приводит к активации NOS и повышению концентрации NO (Osborne et al., 2004).

Предполагается, что нейротоксичность NO обусловлена образованием пероксинитрита ($ONOO^-$) при взаимодействии NO с супероксид-анион-радикалом. *In vitro* скорость этой реакции в три раза выше, чем активность супероксиддисмутазы (СОД) (Ischiropoulos, Beckman, 2003; Beckman et al., 1990). Таким образом, при значительных концентрациях NO эффективно конкурирует с СОД за супероксид-анион.

Повышенное образование супероксидного анион-радикала при ишемии наблюдается на стадии реперфузии (Beckman, 1991). Химическое действие пероксинитрита достаточно сложно. Он может проявлять активность и как гидроксильный радикал, и как радикал двуокиси азота. Пероксинитрит может нитровать и гидроксилировать ароматические кольца аминокислотных остатков, а также окислять ДНК и сульфгидрильные группы белков (Ischiropoulos, Beckman, 2003), что может являться сигналом для апоптоза.

Для изучения молекулярных механизмов развития ишемии нервных тканей в сетчатке принципиальное значение имеет выбор соответствующей модели. Ише-

мия мозга в эксперименте достигается обычно путем кратковременной окклюзии сонной артерии, что позволяет изучать как механизм ишемии, так и механизм реперфузии. Существует несколько методик создания экспериментальной ишемии (Minhas et al., 2012), наиболее распространенными из которых являются искусственное повышение внутриглазного давления (Buchi et al., 1994) или наложение лигатуры на сосуды в области зрительного нерва (Otori et al., 1997). Каждый из этих подходов имеет свои недостатки. Метод повышения внутриглазного давления очень чувствителен к любым механическим воздействиям, что делает результаты нестабильными. Кроме того, повышение ВГД неизбежно ведет к дегенерации ганглиозных клеток, которая может и не быть обусловлена ишемией. Во втором случае при наложении лигатуры неизбежно повреждаются не только сосуды, но и зрительный нерв, что приводит к независимым от ишемии дополнительным патологическим изменениям в сетчатке. Таким образом, имеющиеся модели не могут дифференцировать гибель клеток сетчатки, вызванную ишемией, от гибели клеток, обусловленной независимой от ишемии дегенерацией клеток сетчатки. Понимание отличий этих механизмов патогенеза принципиально важно как для поиска перспективных лекарственных средств, так и для выбора правильной стратегии лечения. Так, антиишемические средства могут и не предотвращать гибель нейронов, вызванную другими причинами.

Избежать упомянутых недостатков при моделировании ишемии можно путем непосредственного локального воздействия лазерного излучения на магистральные ретинальные сосуды, что вполне выполнимо, поскольку они хорошо видны и доступны для лазерной коагуляции. Эта модель является удобной, так как позволяет избежать, с одной стороны, указанных выше недостатков, а с другой – получать избирательное тромбирование сосудов, создаваемое лазерной коагуляцией. Это позволяет, выбирая различные отделы магистральных ретинальных сосудов или их ветвей и изменяя параметры лазерного излучения, создавать как локальную, так и обширную ишемию сетчатки. Предлагаемая нами модель с использованием лазерной коагуляции имеет ряд преимуществ. Во-первых, изменение скорости кровотока происходит не в результате длительного (1–2 часа) воздействия, а в доли секунды (время экспозиции лазерного излучения). Это позволяет изучать ишемические нарушения в остром периоде. Во-вторых, модель быстро и легко реализуема при наличии лазерного оборудования и, в-третьих, лазерная коагуляция моделирует такое офтальмологическое заболевание, как тромбоз ретинальных сосудов. На описанной выше модели нами продемонстрировано также защитное действие оксида азота от ишемических повреждений клеток сетчатки. При этом важными являются два аспекта. Во-первых, ретинальные сосуды хорошо видны в офтальмоскопе: действие сосудорасширяющих факторов можно наблюдать в данном случае в реальном времени. По существу, такой подход позволяет визуально наблюдать за реакцией сосуда на гипоксию *in vivo*. Поскольку мы предполагали, что нитриты будут восстанавливаться в сосуде при гипоксии, это должно было приводить к резкому расширению сосуда. Во-вторых, коагуляция сосуда вызывает ишемию сетчатки и, если нитриты действительно восстанавливаются в сосуде при гипоксии, это должно было косвенно проявиться как защитный эффект при разви-

тии ишемии сетчатки. Наиболее удобной для этих исследований оказалась модель ишемии на кроликах. Ретинальные сосуды кролика хорошо видны, что позволяет легко наблюдать их реакцию на лазерное воздействие. Кроме того, моделирование ишемии на кроликах позволит в перспективе использовать метод ОСТ (ocular computer tomography) для оценки тонких изменений сетчатки при ишемии, а также реконструировать трехмерное изображение ретинальных сосудов и точно измерять их диаметр.

Лазерная коагуляция ретинальных сосудов приводит к значительным изменениям в кровенаполнении сосудов. Если в норме сосуды сетчатки в области диска зрительного нерва не извиты и соответствуют средней норме, то сразу после лазерного воздействия видно, что сосуды запустели и резко уменьшились в диаметре (рис. 1а,б).

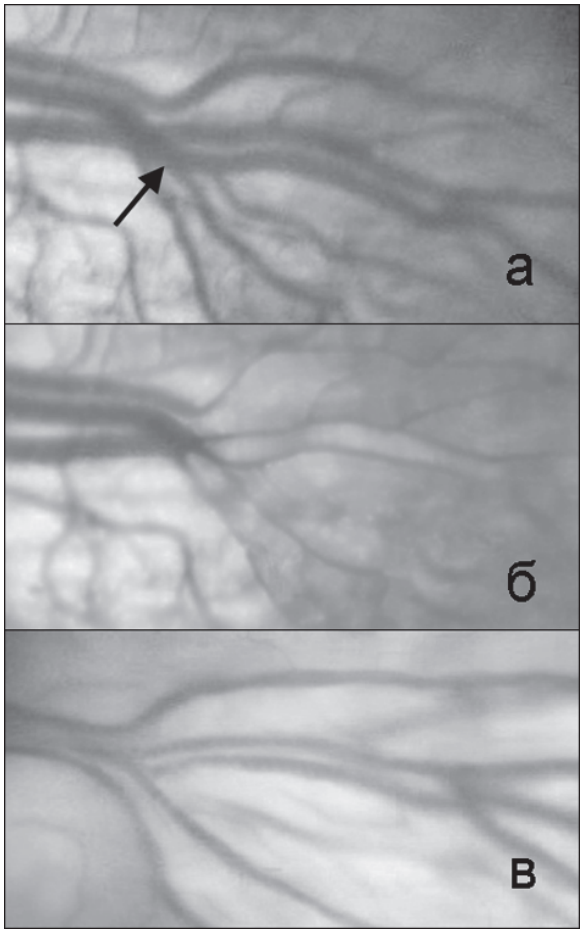


Рис. 1. Действие нитрита натрия на сосуды глазного дна после лазерной коагуляции

а – фотография глазного дна кролика до лазерной коагуляции (стрелка указывает место последующего лазерного воздействия); б – то же, сразу после лазерной коагуляции, в – то же, что «б», через 15 минут после введения нитрита натрия

Для выяснения возможного действия нитритов на сетчатку глаза и ретинальные сосуды нитрит натрия вводили животным как до, так и после проведения лазерной коагуляции. В том случае, когда нитрит натрия вводили кролику в течение 15 минут после лазерной коагуляции в количестве 20 мг/кг массы, наблюдалось восстановление кровенаполнения сосудов непосредственно за зоной лазерного воздействия (рис. 1в). В самих поврежденных сосудах начинается восстановление кровообращения. Таким образом, введение нитрита натрия на фоне гипоксии приводит к быстрому расслаблению сосудов, что свидетельствует о том, что в условиях ишемии нитрит быстро восстанавливается до оксида азота. При предварительном введении нитритов картина была другой. Животному сначала вводили нитрит натрия (20 мг/кг), а затем, через 15 минут, производили лазерную коагуляцию и наблюдали за изменением сосудов глазного дна (рис. 2). В этом случае лазерное воздействие создавало не стойкий, а лишь кратковременный спазм сосуда с быстрым последующим восстановлением кровенаполнения и проводимости сосуда.

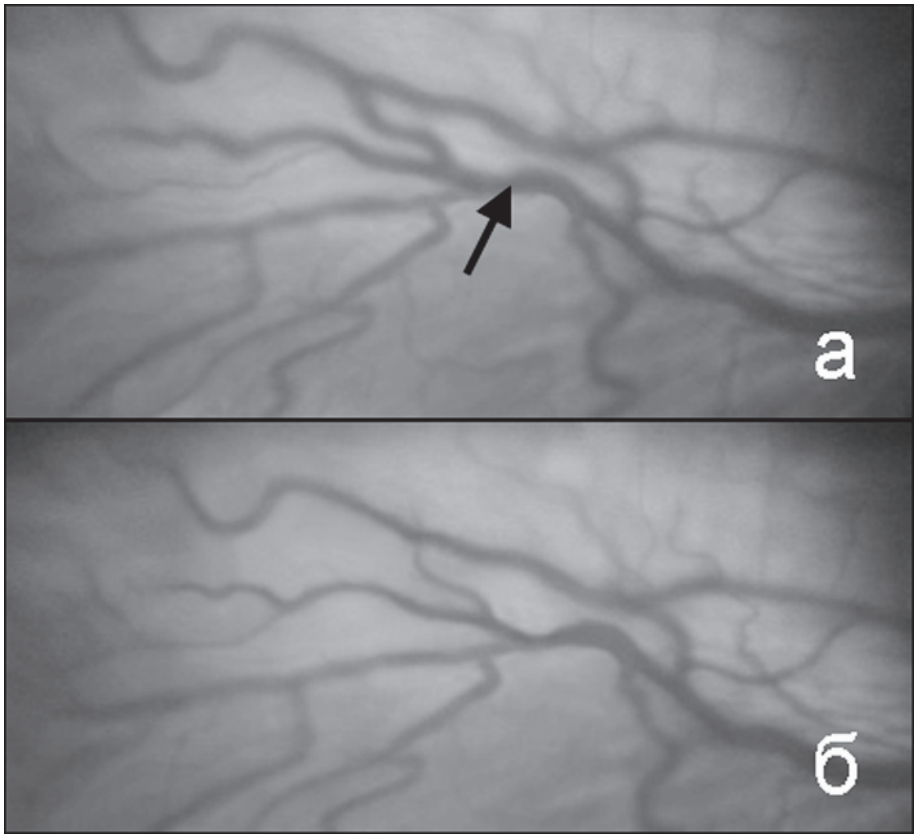


Рис. 2. Введение нитрита натрия предотвращает развитие ишемии сетчатки при лазерной коагуляции сосудов

а – фотография глазного дна кролика после введения нитрита до лазерной ишемии (стрелка указывает место последующего лазерного воздействия); б – то же, сразу после лазерного воздействия на фоне предварительного введения препарата

Таким образом, можно заключить, что нитрит натрия в условиях острой гипоксии приводит к почти мгновенному расширению сосудов, что и делает лазерную коагуляцию неэффективной. Можно предполагать, что в условиях гипоксии, когда нитриты могут связываться с гемом гемсодержащих белков, может происходить их восстановление до оксида азота в концентрациях, достаточных для быстрого и полного расслабления сосудов.

Известно, что ишемия сетчатки сопровождается характерными изменениями в картине фотоэлектрической активности сетчатки – электроретинограмме (ЭРГ). Использование ЭРГ позволило оценить действие нитритов на ретинальные сосуды по изменению электрической реакции сетчатки глаза, то есть независимым методом. Регистрация ЭРГ выполнялась сразу после лазерной коагуляции, после введения препарата на фоне лазерного воздействия и после лазерного воздействия на фоне предварительного введения нитрита натрия. Лазерная коагуляция сосудов сетчатки приводила к резкому снижению амплитуд a- и b-волн ЭРГ (рис. 3). Введение нитрита натрия в дозе 20 мг/кг массы через 15 минут после лазерной коагуляции приводило к более быстрому восстановлению a- и b-волн ЭРГ. Наибольший положительный эффект препарата был выявлен при его введении до создания лазерной ишемии сетчатки, где не наблюдалось угнетения биопотенциалов.

Глиальный индекс $К_{Г}$, рассчитываемый по отношению амплитуд b-волны ЭРГ и РЭРГ (12 Гц), равнялся 1,8 при норме 2,3–2,5 относительных единиц. Известно, что возрастание глиального индекса, отражающее активизацию метаболизма клеток Мюллера, является характерным признаком ретинальной ишемии. Однако при острых нарушениях кровообращения в бассейне центральной артерии сетчатки b-волна ЭРГ быстрее реагирует на гипоксию сетчатки, связанную с сосудистой катастрофой, чем низкочастотная РЭРГ. Поэтому опережающее снижение амплитуды

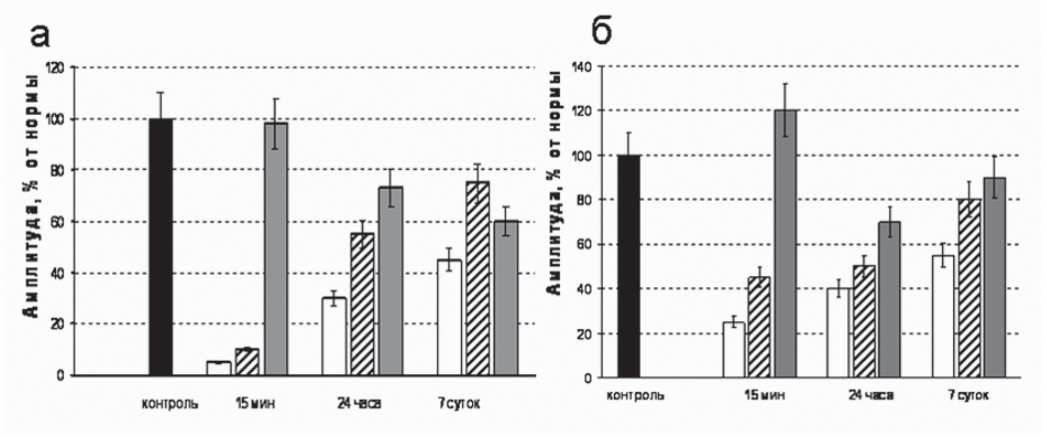


Рис. 3. Динамика изменения амплитуд волн ЭРГ при действии нитритов

а – амплитуда a-волны ЭРГ, б – амплитуда b-волны ЭРГ. Черный цвет – амплитуды a- и b-волн ЭРГ до проведения операции. Белый – то же, через 15 мин после проведения лазерной коагуляции. Штриховка – амплитуды a- и b-волн в том случае, когда через 15 мин после проведения лазерной коагуляции животному вводился нитрит натрия. Серый – амплитуда волны в том случае, когда лазерная коагуляция проводилась через 15 мин после введения нитрита натрия, $p<0,05$

b-волны ЭРГ сразу после лазерной коагуляции сосудов приводит к снижению $К_Г$, отражая значительные нарушения в сетчатке. Действительно, клинические наблюдения свидетельствуют о развитии обтурации, кровотечения и запустения сосудов после лазерного воздействия и последующей острой ишемии сетчатки.

Таким образом, полученные нами двумя независимыми методами (ЭРГ и офтальмоскопия) результаты показывают, что введение нитритов экспериментальным животным защищает сетчатку от острой ишемии. Такое действие, по-видимому, обусловлено тем, что при недостатке кислорода in vivo нитрит натрия может восстанавливаться до оксида азота в концентрациях, достаточных для полного расслабления сосудов.

Модель ишемии сетчатки глаза на кроликах в некоторых экспериментах очень удобна, т.к. сосуды глаза хорошо видны, и кровоснабжение сетчатки кролика отличается от кровоснабжения сетчатки человека. У кроликов 2/3 сетчатки питается от хориоидальных сосудов, которые снабжают наружные слои сетчатки. И всего 1/3 сетчатки питается от ретинальных сосудов, которые распадаются на капилляры в пределах ганглиозного слоя и слоя нервных волокон. В то же время у человека, наоборот, 1/3 кровоснабжения осуществляется через хориоидальные сосуды и 2/3 – через ретинальные. Важно отметить, что основной причиной зрительных патологий человека является ишемия, вызванная нарушениями именно в ретинальных сосудах. Наиболее близким объектом для моделирования заднего отрезка глаза является крыса, у которой кровоснабжение сетчатки осуществляется так же, как у человека.

При офтальмоскопии глазного дна сразу после лазерной коагуляции отмечалось резкое сужение магистральных сосудов с полной или почти полной остановкой кровотока, сохраняющейся на протяжении нескольких минут, после чего кровоток частично восстанавливался, но просвет сосуда оставался значительно суженным. На следующий день после операции у некоторых животных наблюдалась стушеванность границ диска зрительного нерва из-за отека окружающей сетчатки, суженные артерии, местами до полной их непроходимости, кровоток в них становился прерывистым. Некоторое расширение вен, по-видимому, было обусловлено одновременным нарушением венозной гемодинамики в результате распространения коагулирующего действия лазерного излучения на стенку расположенного рядом магистрального венозного сосуда.

Через сутки после операции в результате тромбоза магистральных ретинальных сосудов отмечались достаточно выраженные гемодинамические нарушения в ретинальной системе микроциркуляции, приводящие к ишемии внутренних слоев сетчатки. Стойкие гемодинамические нарушения в системе ретинального кровотока через сутки приводили к электрофизиологическим изменениям в сетчатке, характерным для ишемии. Для оценки степени развития ишемии сетчатки широко используется соотношение амплитуд b- и a-волн ЭРГ – индекс b/a (Нероев и др., 2004). a-волна ЭРГ характеризует функциональную активность фоторецепторных клеток, b-волна – внутренних слоев сетчатки, прежде всего биполярных клеток. На следующий день после лазерной коагуляции сосудов амплитуда b-волны ЭРГ снижалась на 40–70% от исходных значений (рис. 4). Угнетение a-волны ЭРГ от-

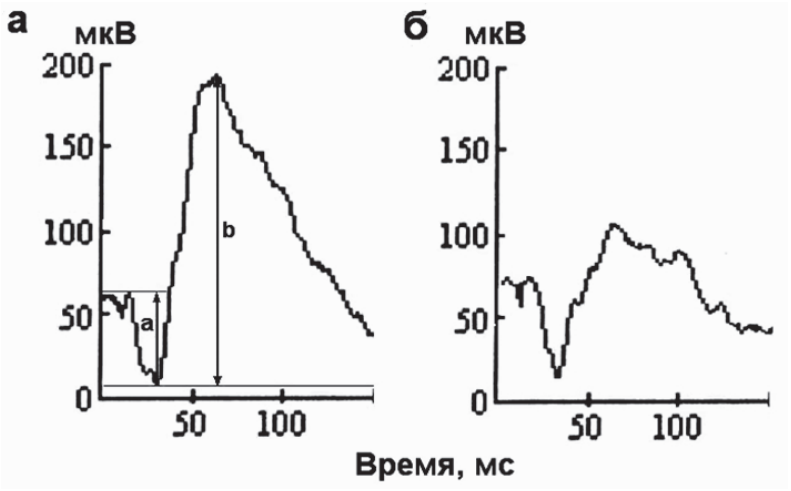


Рис. 4. Запись электроретинограммы крысы
а – ЭРГ интактного животного, б – ЭРГ того же глаза через 1 сутки после лазерной коагуляции ретинальных сосудов

мечалось через сутки не у всех животных. В тех случаях, когда амплитуда a-волны снижалась, угнетение b-волны было более значительным. Изменения b-волны развиваются, как правило, раньше угнетения a-волны и являются более выраженными из-за ухудшения трофики нейронов внутреннего ядерного слоя сетчатки при нарушениях ретинальной циркуляции. В нашем исследовании при развитии острой ишемии сетчатки коэффициент b/a резко снижался – до 1,0–2,0 отн. единиц при его нормальных значениях у крыс 3,3–4,8 ед.

Данные электроретинографических исследований подтверждаются гистологическими результатами. Нарушение кровотока в ретинальных сосудах вследствие их тромбирования уже через сутки приводило к ишемическим повреждениям во внутренних слоях сетчатки глаза (рис. 5). Типичными проявлениями ишемического повреждения были кровоизлияния, микрокистовидные изменения в слое нервных волокон, отек ганглиозных клеток, локальное уменьшение плотности нейронов в слое биполярных клеток. Следствием периваскулярного отека явилось истончение и микроразрывы внутренней пограничной мембраны, через которые происходила миграция мононуклеарных клеток крови из просвета сосуда в корковые отделы прилежащего стекловидного тела.

Таким образом, результаты наших электрофизиологических и гистологических исследований позволяют заключить, что лазерная коагуляция ретинальных сосудов приводит к развитию характерных ишемических изменений в сетчатке.

Для подтверждения того, что гибель клеток идет по апоптотическому пути, был применен метод TUNEL. Данным методом были выявлены TUNEL-положительные ядра в ганглиозном слое уже через 6 часов после лазерного воздействия на сосуды (рис. 6). Также наблюдался апоптоз амакриновых и ганглиозных клеток через 18 и 24 часа после лазерной коагуляции. При лазерной коагуляции ретинальных сосу-

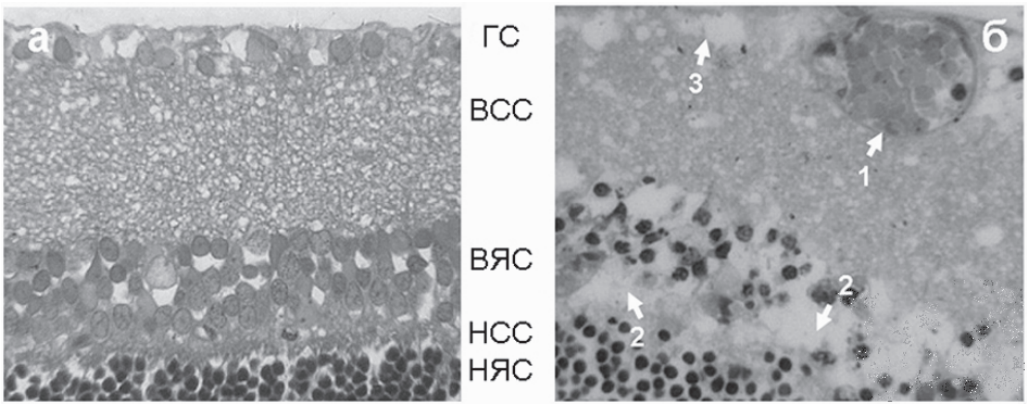


Рис. 5. Гистологическое исследование сетчатки крысы

а – контроль; б – через сутки после лазерной коагуляции сосудов. НЯС – наружный ядерный слой, НСС – наружный синаптический слой, ВЯС – внутренний ядерный слой, ВСС – внутренний синаптический слой, ГС – ганглиозный слой. Стрелками на рисунке указаны: 1 – тромбоз ретинальной артериолы, 2 – уменьшение плотности нейронов в слое биполярных клеток, 3 – отек ганглиозных клеток. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. ×400

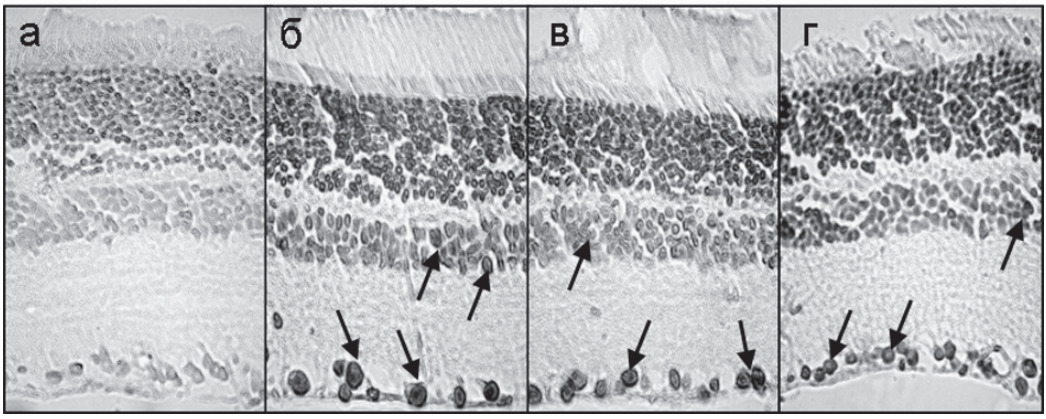


Рис. 6. Выявление апоптотических клеток в сетчатке при ишемии

а – контроль; б – 6 часов после лазерной коагуляции; в – 9 часов после лазерной коагуляции; г – 24 часа после лазерной коагуляции. Стрелками указаны TUNEL-положительные апоптотические ядра сетчатки

дов наибольшее количество апоптотических ядер в ганглиозном слое было выявлено через 24 часа после тромбирования сосудов (60% от общего числа клеток) (рис. 7). Максимальное количество TUNEL-положительных ядер во внутреннем ядерном слое (ВЯС) было обнаружено уже через 9 часов после лазерного воздействия.

Понимание молекулярного механизма гибели клеток при патологии особенно важно при попытках фармакологически предотвратить их гибель. Известно, что гибель нервных клеток при развитии ишемии может идти апоптотическим путем.

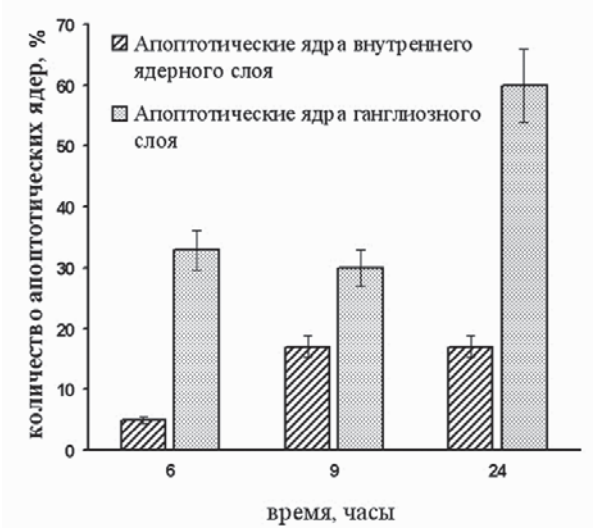


Рис. 7. Зависимость образования апоптотических ядер в сетчатке глаза крысы при ишемии от времени

Можно предполагать, что поскольку повышенная концентрация нитритов в сосудах защищала сетчатку от появления признаков ишемии, то этот механизм должен предотвращать и развитие апоптоза клеток сетчатки.

Иммуногистохимическим методом TUNEL было показано, что предварительное введение нитрита натрия животным приводило к значительному снижению количества TUNEL-положительных ядер в ганглиозном слое и защищало от апоптоза клетки внутреннего ядерного слоя (рис. 8). При предварительном введении нитрита натрия до лазерной коагуляции сосудов сетчатки количество апоптотических клеток в ганглиозном слое сетчатки снижалось на 66%, а во внутреннем ядерном слое – на 50% (рис. 9). Важно отметить, что изменения затрагивали, главным образом, внутренние отделы сетчатки (до ВЯС), которые кровоснабжаются ретинальными сосудами. В наружных отделах, которые питаются из слоя хориокапилляров (слой наружных сегментов фоторецепторов, наружный ядерный слой), видимых морфологических изменений не обнаружено.

Известно, что гибель нервных клеток мозга и сетчатки при некоторых патологиях происходит апоптотическим путем при участии оксида азота. Естественно предполагать, что и при развитии ишемии оксид азота может быть индуктором развития апоптоза. Ранее было установлено, что введение животным конкурентного ингибитора NO-синтазы L-NAME приводит к существенному снижению концентрации оксида азота в клеточных слоях сетчатки и поэтому можно предполагать, что введение этого ингибитора будет влиять на развитие апоптоза. Для подтверждения этого экспериментальным животным вводили ингибитор NO-синтазы L-NAME. Внутрибрюшинное введение этого препарата в дозе 20 мг/кг веса снижало концентрацию оксида азота в клетках сетчатки, и пероксинитрит, очевидно, не образовывался. При предварительном введении L-NAME за 15 минут до лазерного воздействия на

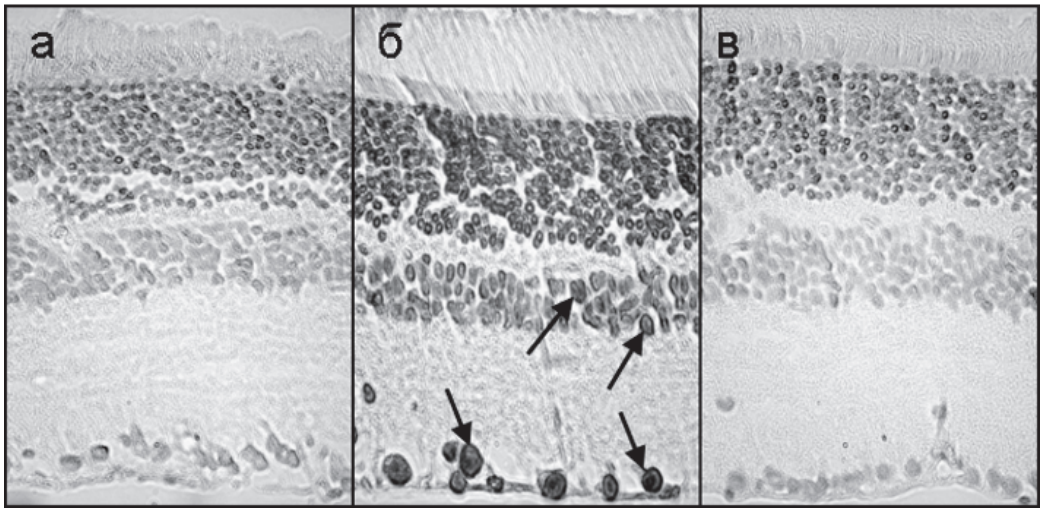


Рис. 8. Защитный эффект нитритов при ишемии сетчатки

а – контроль; б – апоптоз клеток при ишемии; в – сетчатка после лазерной коагуляции на фоне предварительного введения нитрита натрия. Стрелками указаны TUNEL-положительные апоптотические ядра сетчатки

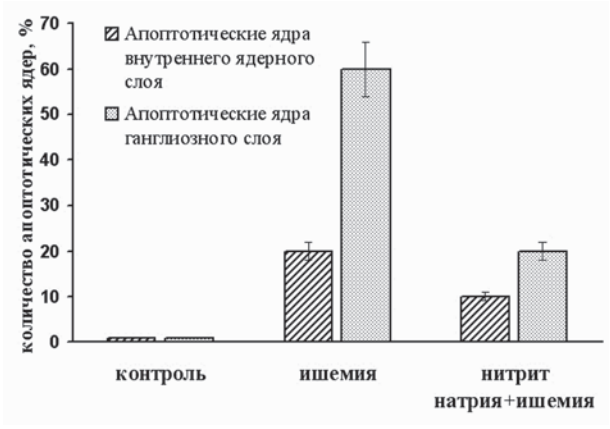


Рис. 9. Количество апоптотических ядер в сетчатке при ишемии и введении нитрита натрия, $p<0,05$

ретинальные сосуды апоптотические клетки во внутренних слоях сетчатки не выявлялись (рис. 10). Лазерная коагуляция сосудов сетчатки глаза приводит к гибели 50% клеток ганглиозного слоя и 30% клеток ВЯС сетчатки. При предварительном введении препарата L-NAME крысам лазерное воздействие на ретинальные сосуды приводит к гибели всего 20% ганглиозных клеток и 15% клеток ВЯС от общего числа клеток (рис. 11). Можно сделать вывод, что ингибитор NO-синтазы L-NAME защищает клетки сетчатки от апоптоза при ишемии. Таким образом, оксид азота является необходимым элементом развития апоптоза в клеточных слоях сетчатки.

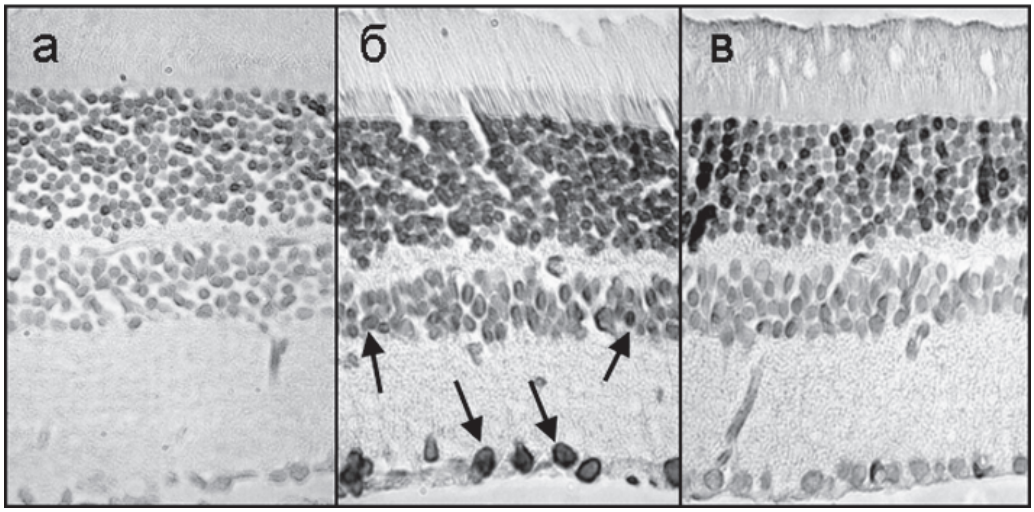


Рис. 10. Защитный эффект L-NAME при ишемии сетчатки

а – контроль, б – апоптоз клеток сетчатки при ишемии, в – сетчатка после лазерной коагуляции на фоне предварительного введения L-NAME. Стрелками указаны TUNEL-положительные апоптотические ядра сетчатки

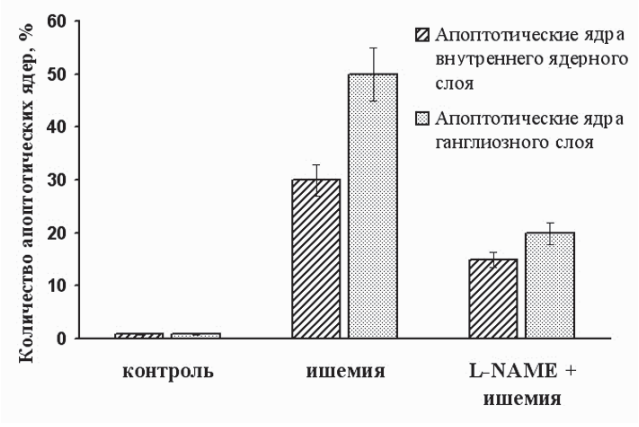


Рис. 11. Количество апоптотических ядер в сетчатке крысы при ишемии и при введении ингибитора NO-синтазы L-NAME, $p<0,05$

Глутаматная интоксикация может являться одним из звеньев длинной цепи ишемического повреждения (Louzada-Junior et al., 1992; Nucci et al., 2005; Russo et al., 2009), но может происходить и независимо от ишемии при различных дегенеративных нарушениях. В работе нами исследовались влияние повышения концентрации глутамата на возникновение нейродегенеративных нарушений в сетчатке и роль оксида азота в этих процессах. NMDA (агонист глутамата) вводили непосредственно в глаз экспериментальным животным в дозе 200 нмоль/глаз. И уже через сутки методом TUNEL можно было выявить апоптотические ядра во внутреннем ядер-

ном слое и слое ганглиозных клеток сетчатки (рис. 12). Введение NMDA приводит к апоптотической гибели 60% ганглиозных клеток от общего числа клеток ганглиозного слоя и 50% клеток внутреннего ядерного слоя от общего числа клеток этого слоя. ЭРГ также ясно свидетельствует о снижении функциональной активности во внутренних слоях сетчатки: наблюдается уменьшение амплитуды b-волны на 50% от нормы (рис. 13).

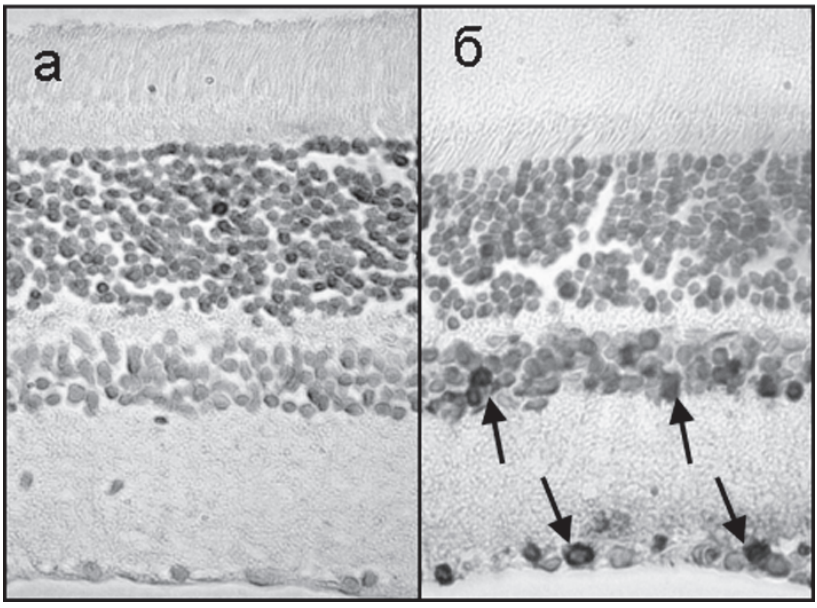


Рис. 12. Структурные изменения клеток сетчатки после введения NMDA
а – контроль, б – через 24 часа после введение NMDA. Стрелками указаны TUNEL-положительные апоптотические ядра

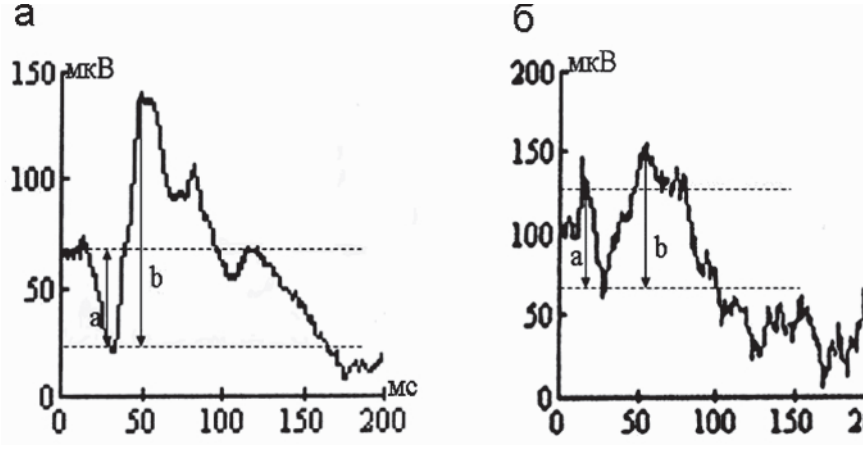


Рис. 13. Запись электроретинограммы крысы
а – ЭРГ контрольного животного, б – ЭРГ того же глаза через 1 сутки после введения NMDA

Известно, что передача сенсорного сигнала от фоторецепторов к последующим слоям сетчатки осуществляется посредством глутамата. Введение агониста глутамата NMDA приводит к блокированию этой передачи и увеличению концентрации глутумата в синаптической щели. Это приводит к тому, что ответы фоторецепторных клеток сохраняются, а ответы более глубоких слоев сетчатки значительно уменьшаются. Именно такая картина наблюдается и при электроретинографических исследованиях. Как видно, а-волна ЭРГ, которая обусловлена электрической активностью фоторецепторов, практически не изменяется, а b-волна, основной вклад в которую вносят ответы биполярных клеток, существенно уменьшена.

Введение NMDA приводило к развитию апоптоза в клеточных слоях сетчатки. Так, через 24 часа после введения апоптотические ядра обнаруживались во внутреннем ядерном слое и слое ганглиозных клеток, то есть именно в тех слоях, где медиаторная роль глутамата установлена. Для того чтобы выяснить, по какому пути идет гибель клеток, в стекловидное тело глаза вместе с NMDA вводили ингибитор NO-синтазы L-NAME (0,1 мг/глаз). При этом количество апоптотических ядер в сетчатке резко снижалось (рис. 14). Введение L-NAME вместе с NMDA в стекловидное тело глаза приводило к снижению количества апоптотических ядер во внутреннем ядерном слое и слое ганглиозных клеток на 50% и 70%, соответственно (рис. 15).

Для подтверждения предположения, что в разработанных нами экспериментальных моделях глазных патологий именно высокая концентрация NO является токсическим фактором, нам требовалось создать 20-кратный избыток NO в сетчатке. Для этого мы вводили в глаз донор оксида азота динитрозильный комплекс железа с глутатионом (ДНК-Ж). Динитрозильные комплексы железа в тканях жи-

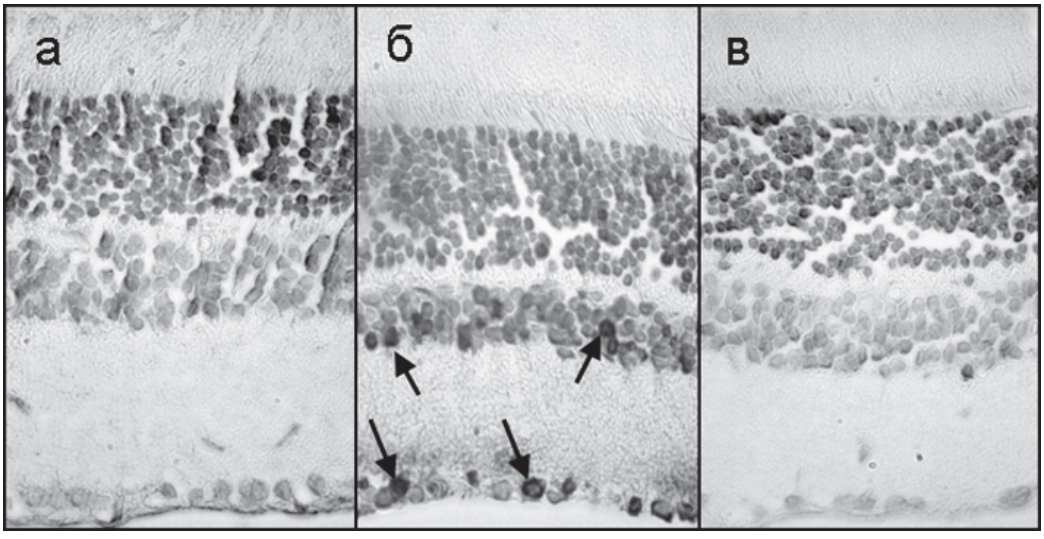


Рис. 14. Защитный эффект L-NAME при глутаматной интоксикации сетчатки

а – контроль, б – 24 часа после введения NMDA, в – 24 часа после введения NMDA и L-NAME. Стрелками указаны TUNEL-положительные апоптотические ядра сетчатки

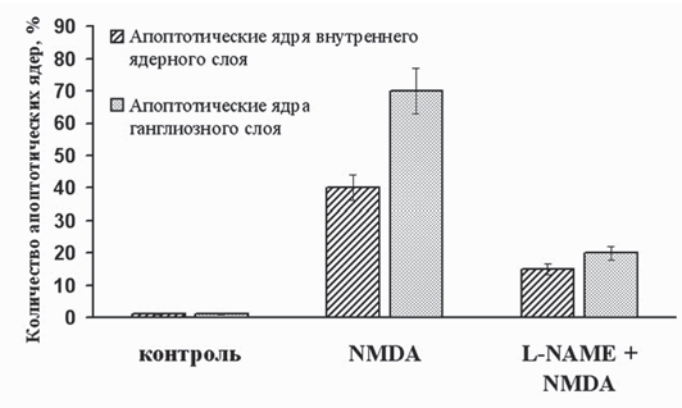


Рис. 15. Количество апоптотических ядер в сетчатке глаза крысы при введении NMDA и ингибитора NO-синтазы L-NAME, $p<0,05$

вотных и человека продуцируют свободные молекулы оксида азота и могут функционировать в качестве эндогенных универсальных регуляторов биохимических и физиологических процессов. ДНК-Ж обеспечивают стабилизацию и перенос NO в биосистемах. Так как компоненты этого комплекса уже содержатся в системе, то его введение не является токсичным для клеток сетчатки. Ниже приведена структурная формула ДНК-Ж с глутатионом и распад этого соединения на составляющие компоненты с образованием оксида азота.

Введение в стекловидное тело глаза крыс динитрозильного комплекса железа с глутатионом (10^{-5}–10^{-8} моль/глаз) через сутки приводило к появлению апоптотических ядер в сетчатке. Методом TUNEL было выявлено, что апоптозу подверглись клетки внутреннего ядерного и ганглиозного слоев сетчатки (рис. 16). При этом апоптоз был выявлен только при введении ДНК-Ж в дозах 10^{-7} и 10^{-8} моль/глаз. А при введении большего количества препарата (10^{-6} и 10^{-5} моль/глаз) TUNEL-положительные ядра в сетчатке выявить не удалось. При введении ДНК-Ж в количестве 10^{-7} моль/глаз количество апоптотических клеток в ганглиозном слое сетчатки увеличилось на 30% от нормы (рис. 17). При введении препарата в количестве 10^{-8}

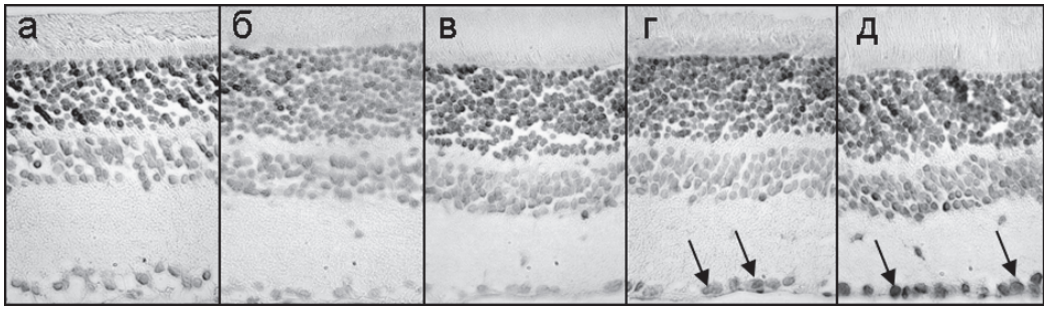


Рис. 16. Введение ДНК-Ж в стекловидное тело глаза крысы

а – контроль, б – ДНК-Ж, 10^{-5} моль/глаз, в – ДНК-Ж, 10^{-6} моль/глаз, г – ДНК-Ж, 10^{-7} моль/глаз, д – ДНК-Ж, 10^{-8} моль/глаз. Стрелками указаны TUNEL-положительные апоптотические ядра сетчатки

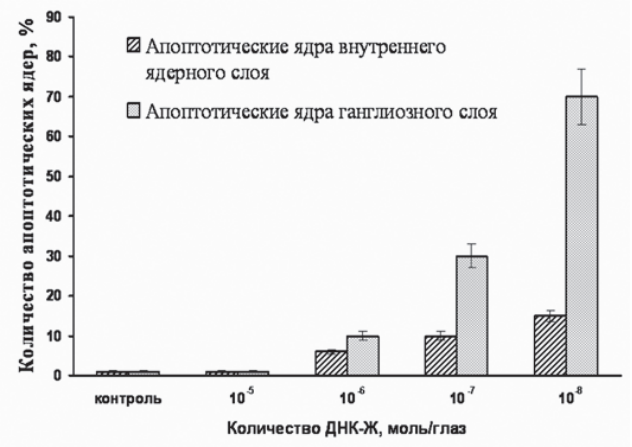


Рис. 17. Количество апоптотических ядер в сетчатке глаза крысы при введении ДНК-Ж, $p<0,05$

моль/глаз апоптозу подверглось до 70% клеток ганглиозного слоя сетчатки от общего количества клеток. При этом клетки внутреннего ядерного слоя подвергались апоптозу в незначительной степени: их количество составило всего 15% от нормы.

Таким образом, введение донора оксида азота ДНК-Ж в низких дозах приводит к апоптозу клеток сетчатки экспериментальных животных, так как избыток NO в ткани ведет к образованию пероксинитрита, а следовательно и к гибели клеток.

Литература

Barnett N.L., Pow D.V., Bull N.D. Differential perturbation of neuronal and glial glutamate transport systems in retinal ischaemia // Neurochem. Int. 2001. Vol. 39. P. 291-299.

Beckman J.S. The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury // J. Dev. Physiol. 1991. Vol. 1. P. 53-59.

Beckman J.S., Beckman T.W., Chen J. et al. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. Vol. 87. P. 1620-1624.

Bek T. Inner retinal ischaemia: current understanding and needs for further investigations // Acta Ophthalmol. 2009. Vol. 87. № 4. P. 362-367.

Billups B., Attwell D. Modulation of nonvesicular glutamate release by pH // Nature. 1996. Vol. 379. P. 171-174.

Brandstatter J.H., Hartveit E., Sassoe Pognetto M., Wassle H. Expression of NMDA and high-affinity kainate receptor subunit mRNAs in the adult rat retina // Eur. J. Neurosci. 1994. Vol. 6. P. 1100-1112.

Buchi E.R., Lam T.T., SuvaizdisI., Tso M.O. Injuries induced by diffuse photodynamic action in retina and choroid of albino rats. Morphologic study of an experimental model // Retina. 1994. Vol. 14. P. 370-378.

Celebi S., Dilsiz N., Yilmaz T., Kukner A.S. Effects of melatonin, vitamin E and octreotide on lipid peroxidation during ischemia–reperfusion in the guinea pig retina // Eur. J. Ophthalmol. 2002. Vol. 12. P. 77-83.

Chan P.H. Role of oxidants in ischemic brain damage // Stroke. 1996. Vol. 27. P. 1124-1129.

Chen Y.N., Yamada H., Mao W. et al. Hypoxia-induced retinal ganglion cell death and the neuroprotective effects of beta-adrenergic antagonists // Brain Res. 2007. Vol. 7. № 1148. P. 28-37.

Chu XP, Xiong ZG. Physiological and pathological functions of acid-sensing ion channels in the central nervous system // Curr. Drug Targets. 2012. Vol. 13. № 2. P. 263-271.

Das S., Lin D., Jena S. et al. Protection of retinal cells from ischemia by a novel gap junction inhibitor // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. Vol. 373. P. 504-508.

Dratviman-Storobinsky O., Hasanreisoglu M., Offen D. et al. Progressive damage along the optic nerve following induction of crush injury or rodent anterior ischemic optic neuropathy in transgenic mice // Mol. Vis. 2008. Vol. 14. P. 2171-2179.

Fulton A.B., Akula J.D., Mocko J.A. et al. Retinal degenerative and hypoxic ischemic disease // Doc. Ophthalmol. 2009. Vol. 118. № 1. P. 55-61.

Gaydar V., Ezrachi D., Dratviman-Storobinsky O. et al. Reduction of apoptosis in ischemic retinas of two mouse models using hyperbaric oxygen treatment // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2011. Vol. 29. N. 52. P. 7514-7522.

Gilgun Sherki Y., Rosenbaum Z., Melamed E., Offen D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state // Pharmacol. Rev. 2002. Vol. 54. P. 271-284.

Holcombe D.J., Lengefeld N., Gole G.A., Barnett N.L. The effects of acute intraocular pressure elevation on rat retinal glutamate transport // Acta Ophthalmol. Scand. 2008. Vol. 86. P. 408-414.

Ischiropoulos H., Beckman J.S. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? // J. Clin Invest. 2003. Vol. 111. P. 163-169.

Ju W.K., Kim K.Y., Neufeld A.H. Increased activity of cyclooxygenase-2 signals early neurodegenerative events in the rat retina following transient ischemia // Exp. Eye Res. 2003. Vol. 77. P. 137-145.

Kaur C., Foulds W.S., Ling E.A. Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage // Clin. Ophthalmol. 2008. № 4. P. 879-89.

Kergoat H., HérardM.E., Lemay M. RGC sensitivity to mild systemic hypoxia // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2006. Vol. 47. P. 5423-5427.

Kim S.J., Chung I.Y., Choi W.S. et al. Triamcinolone acetonide prevents enhancement of hypoxia-induced neuronal and inducible nitric oxide synthases in the retinas of rats with oxygen-induced retinopathy // Korean J. Ophthalmol. 2012. Vol. 26. № 6. P. 455-461.

Kowluru R.A., Zhong Q. Beyond AREDS: is there a place for antioxidant therapy in the prevention/treatment of eye disease? // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2011. Vol. 2. P. 8665-8671.

Lam T.T., Fu J., Hrynewycz M., Tso M.O. The effect of aurintricarboxylic acid, an endonuclease inhibitor, on ischemia/reperfusion damage in rat retina // J. Ocul. Pharmacol. Ther. 1995. Vol. 11. P. 253-259.

Li M., Inoue K., Branigan D. et al. Acid-sensing ion channels in acidosis-induced injury of human brain neurons // J. Cereb. Blood Flow Metab. 2010. Vol. 30. № 6. P. 1247-1260.

Li S.Y., Fu Z.J., Lo A.C. Hypoxia-induced oxidative stress in ischemic retinopathy // Oxid. Med. Cell Longev. 2012. P 426769.

Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons // Physiol. Rev. 1999. Vol. 79. P. 1431-1568.

Louzada-Junior P., Dias J.J., Santos W.F. et al. Glutamate release in experimental ischaemia of the retina: an approach using microdialysis // J. Neurochem. 1992. Vol. 59. P. 358-363.

Minhas G., Morishita R., Anand A. Preclinical models to investigate retinal ischemia: advances and drawbacks // Front. Neurol. 2012. Vol. 3. P. 75.

Musleh W., Bruce A., Malfroy B., Baudry M. Effects of EUK-8, a synthetic catalytic superoxide scavenger, on hypoxia- and acidosis-induced damage in hippocampal slices // Neuropharmacology. 1994. Vol. 33. № 7. P. 929-934.

Nishizawa Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia // Life Sci. 2001. Vol. 69. P. 369–381.

Nucci C., Tartaglione R., Rombolà L. et al. Neurochemical evidence to implicate elevated glutamate in the mechanisms of high intraocular pressure (IOP)-induced retinal ganglion cell death in rat // Neurotoxicology. 2005. Vol. 26. P. 935-41.

Oliver C.N., Starke-Reed P.E., Stadtman E.R. et al. Oxidative damage to brain proteins, loss of glutamine synthetase activity, and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. Vol. 87. P. 5144-5147.

Olney J.W., Farber N.B. Efficacy of clozapine compared with other antipsychotics in preventing NMDA-antagonist neurotoxicity // J. Clin. Psychiatry. 1994. Vol. 55. P. 43-46.

Osborne N.N., Casson R.J., Wood J.P. et al. Retinal ischemia: Mechanisms of damage and potential therapeutic strategies // Prog. Retin. Eye Res. 2004. Vol. 23. P. 91-147.

Otori, Y., Shimada, S., Morimura, H. et al. Expression of c-fos and c-jun mRNA following transient retinal ischemia: an approach using ligation of the retinal central artery in the rat // Surv. Ophthalmol. 1997. Vol. 42. P. 96–104.

Petty M.A., Wettstein J.G. White matter ischaemia // Brain Res. Brain Res. Rev. 1999. Vol. 31. P. 58-64.
Pow D.V., Barnett N.L., Penfold P. Are neuronal transporters relevant in retinal glutamate homeostasis? // Neurochem. Int. 2000. Vol. 37. P. 191-198.
Produit-Zengaffinen N., Pournaras C.J., Schorderet D.F. Retinal ischemia-induced apoptosis is associated with alteration in Bax and Bcl-x(L) expression rather than modifications in Bak and Bcl-2 // Mol. Vis. 2009. Vol. 15. P. 2101-2110.
Qu J., Wang D., Grosskreutz C.L. Mechanisms of retinal ganglion cell injury and defense in glaucoma // Exp. Eye Res. 2010. Vol. 91. P. 48-53.
Rao S.D., Yin H.Z., Weiss J.H. Disruption of glial glutamate transport by reactive oxygen species produced in motor neurons // J. Neurosci. 2003. Vol. 23. P. 2627-2633.
Russo R., Rotiroti D., Tassorelli C. et al. Identification of novel pharmacological targets to minimize excitotoxic retinal damage // Int. Rev. Neurobiol. 2009. Vol. 85. P. 407-423.
Russo R., Cavaliere F., Varano G.P. et al. Impairment of neuronal glutamate uptake and modulation of the glutamate transporter GLT-1 induced by retinal ischemia // PLoS One. 2013. Vol. 8. № 8. P. e69250.
Schmidt M., Giessl A., Laufs T. et al. How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin mediated oxygen supply in the mammalian retina // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. P. 1932-1935.
Schwartz-Bloom R.D., Sah R. g-Aminobutyric acid A neurotransmission and cerebral ischemia // J. Neurochem. 2001. Vol. 77. P. 353-371.
Sennlaub F., Courtois Y., Goureau O. Inducible nitric oxide synthase mediates retinal apoptosis in ischemic proliferative retinopathy // J. Neurosci. 2002. Vol. 22. № 10. P. 3987-3993.
Sharma R.K. Molecular neurobiology of retinal degeneration // Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. Sensory Neurochemistry. Lajtha A. and Johnson D.A.: Springer-Verlag, 2007. P. 47-92.
Sharma R.K., Ehinger B. Development and Structure of the Retina // Adler's physiology of the eye: Clinical application. P.L. Kaufman, A. Alm: St. Louis, 2003. P. 319-347.
Sherwood T.W., Lee K.G., Gormley M.G., Askwith C.C. Heteromeric acid-sensing ion channels (ASICs) composed of ASIC2b and ASIC1a display novel channel properties and contribute to acidosis-induced neuronal death // J. Neurosci. 2011. Vol. 31. № 26. P. 9723-9734.
Shimizu H., Graham S.H., Chang L.H. et al. Relationship between extracellular neurotransmitter amino acids and energy metabolism during cerebral ischemia in rats monitored by microdialysis and in vivo magnetic resonance spectroscopy // Brain Res. 1993. Vol. 605. P. 33-42.
Siesjo B.K., Katsura K., Kristian T. Acidosis-related damage // Adv. Neurol. 1996. Vol. 71. P. 209-233.
Siliprandi R., Canella R., Carmignoto G. et al. N-methyl-D-aspartate-induced neurotoxicity in the adult rat retina // Vis. Neurosci. 1992. Vol. 8. P. 567-573.
Singh M., Savitz S.I., Hoque R. et al. Cell-specific caspase expression by different neuronal phenotypes in transient retinal ischemia // J. Neurochem. 2001. Vol. 77. P. 466-475.
Sivakumar V., Foulds W.S., Luu C.D. et al. Hypoxia-induced retinal ganglion cell damage through activation of AMPA receptors and the neuroprotective effects of DNQX // Exp. Eye Res. 2013. Vol. 109. P. 83-97.
Steinberg R. Monitoring communications between photoreceptors and pigment epithelial cells: effects of "mild" systemic hypoxia // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1987. Vol. 28. P. 1888-1903.
Stitt A.W., O'Neill C.L., O'Doherty M.T. et al. Vascular stem cells and ischaemic retinopathies // Prog. Retin. Eye Res. 2011. Vol. 30. № 3. P. 149-166.
Thoreson W.B., Witkovsky P. Glutamate receptors and circuits in the vertebrate retina // Prog. Retin. Eye Res. 1999. Vol. 18. P. 765-810.
Tombaugh G.C., Sapolsky R.M. Evolving concepts about the role of acidosis in ischemic neuropathology // J. Neurochem. 1993. Vol. 61. № 3. P. 793-803.
Wahl F., Obrenovitch T.P., Hardy A.M. et al. Extracellular glutamate during focal cerebral ischemia in rats: time course and calcium dependency // J. Neurochem. 1994. Vol. 63. P. 1003-1011.
Wang J., Jiang S., Kwong J.M. et al. Nuclear factor-kappaB p65 and upregulation of interleukin-6 in retinal ischemia/ reperfusion injury in rats // Brain Res. 2006. Vol. 1081. P. 211-218.
Wemmie J.A., Chen J., Askwith C.C. et al. The acid activated ion channel ASIC contributes to synaptic plasticity, learning, and memory // Neuron. 2002. Vol. 34. P. 463-477.
Young C., Tenkova T., Dikranian K., Olney J.W. Excitotoxic versus apoptotic mechanisms of neuronal cell death in perinatal hypoxia/ischemia // Curr. Mol. Med. 2004. Vol. 4. P. 77-85.

Zacchigna S., de Almodovar C.R., Lafuste P., Carmeliet P. Vascular and Neuronal Development: Intersecting Parallelisms and rossroads // Therapeutic Neovascularization – Quo Vadis? Eds. E. Deindl, C. Kupatt. Springer, 2007. P. 159-189.

Zhang Y., Cho C.H., Atchaneeyasakul L.O. et al. Activation of the mitochondrial apoptotic pathway in a rat model of central retinal artery occlusion // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2005. Vol. 46. P. 2133-2139.

Zhang B., Safa R., Rusciano D., Osborne N.N. Epigallocatechin gallate, an active ingredient from green tea, attenuates damaging influences to the retina caused by ischemia/reperfusion // Brain Res. 2007. Vol. 1159. P. 40-53.

Флуорофоры липофусциновых гранул в клетках ретинального пигментного эпителия и аутофлуоресценция глазного дна человека как новый неинвазивный метод диагностики старческих изменений и дегенеративных заболеваний сетчатки

М.А. Островский, Т.Б. Фельдман, М.А. Яковлева, С.А. Борзенок, П.М. Арбуханова

Содержание

1. Введение
2. Некоторые технические характеристики конфокального лазерного сканирующего офтальмоскопа (Гейдельбергский ретинальный анализатор HRA-2, Гейдельберг, Германия)
3. Природа флуорофоров, ответственных за аутофлуоресценцию глазного дна
4. Образование флуорофоров – продуктов взаимодействия свободного *транс*-ретиналя с аминогруппами белка и липидов в фоторецепторных клетках (исследование *in vitro* на модельных системах)
5. Флуорофоры липофусциновых гранул из клеток ретинального пигментного эпителия кадаверных глаз человека
   5.1. Исследование структуры и флуоресценции одиночной липофусциновой гранулы
   5.2. Спектральные характеристики флуорофоров липофусциновых гранул
   5.3. ВЭЖХ-анализ синтетического A2E и продуктов его облучения
   5.4. Компонентный спектральный ВЭЖХ-анализ хлороформного экстракта ретинального пигментного эпителия
6. Заключение

1. Введение

Согласно Бюллетеню ВОЗ, макулярная дегенерация (дистрофия) сетчатки является ведущей причиной слепоты и слабовидения в развитых странах (AREDS, 2000). Распространенность возрастной макулярной дегенерации (ВМД) составляет 300 человек на 100 тысяч населения, т.е. 25–30 млн человек в мире страдает ВМД. В возрасте старше 40 лет страдает 25–40% населения, среди лиц старше 60 лет данная патология выявляется у 58% населения. Таким образом, проблема развития и

Сокращения: ВМД – возрастная макулярная дегенерация; ЛГ – липофусциновые гранулы; НСП – наружные сегменты палочек сетчатки; ПТР – полностью-*транс*-ретиналь; РПЭ – ретинальный пигментный эпителий; A2E – N-ретинил-N-ретинилиденэтаноламин; CID – индуцированная столкновениями диссоциация; PE – фосфатидилэтаноламин.

прогрессирования ВМД становится все более острой в связи с увеличением среди населения доли лиц пожилого возраста. При этом прослеживается тенденция к возникновению клинических форм макулодистрофии у лиц и более молодого возраста (Klein et al., 2001; Williams et al., 1998). В России заболеваемость ВМД составляет 15 человек на 1000 населения (Либман, Шахова, 2000).

В своем развитии ВМД проходит несколько стадий. С учетом клинических и патоморфологических особенностей течения различают две формы ВМД: атрофическую, или неэкссудативную («сухую» форму), и экссудативную, или экссудативно-геморрагическую («влажную» форму) (Кацнельсон и др., 1990; Klein et al., 1997; Bird et al., 1995). Наиболее распространенной клинической формой заболевания является неэкссудативная («сухая» форма). Она встречается в 90% случаев и характеризуется дегенеративными изменениями ретинального пигментного эпителия (РПЭ) и фоторецепторов с медленным прогрессирующим снижением зрения. При так называемой «сухой» форме макулодистрофии атрофические фокусы РПЭ расширяются, сливаясь в зону т.н. географической атрофии РПЭ. В макуле формируется четко ограниченный плоский хориоретинальный фокус, приводящий к резкому ухудшению центрального зрения. Более редкая – экссудативная, или «влажная» форма ВМД, наблюдается в 10% случаев. При «влажной» форме макулодистрофии появляются микродефекты мембраны Бруха и локальная отслойка РПЭ и нейроэпителия в области друз. Эти дефекты приводят к возникновению субретинальных и субпигментных геморрагий и, соответственно, к резкому снижению зрения вплоть до его полной потери. Гистологически макулодистрофия характеризуется потерей фоторецепторов, гиперплазией или атрофией РПЭ, утолщением мембраны Бруха и наличием субпигментных отложений – друз (Fine et al., 2000; Klein et al., 2004).

Патогенез ВМД до сих пор остается неизвестным. Главным фактором риска в возникновении заболевания является возраст. Помимо возраста существенную роль играют генетические факторы, а также факторы окружающей среды, в том числе свет как фактор, усугубляющий развитие болезни (Ambati et al., 2003; AREDS, 2000; Chang et al., 2011; Островский, 2005). Основная задача практического здравоохранения – проведение превентивных мероприятий, направленных на диагностику ранних стадий ВМД, возможную профилактику и улучшение результатов лечения этого тяжелейшего глазного заболевания (Smith, 2010).

Что касается диагностики, то в последние годы наряду с такими традиционными методами диагностики ВМД, как флуоресцентная ангиография, электроретинография, оптическая когерентная томография, все большее распространение получает неинвазивный метод аутофлуоресценции глазного дна (Шамшинова, 2001; Spaide, 2003; Bellmann et al., 2003.). В его основе лежит получение изображения, которое создается собственной флуоресценцией глазного дна (аутофлуоресценцией), основным источником которой являются липофусциновые гранулы (ЛГ) в клетках РПЭ (Delori et al., 1995; Holz et al., 2007).

Для регистрации аутофлуоресценции глазного дна был специально разработан конфокальный лазерный сканирующий офтальмоскоп, позволяющий достаточно подробно исследовать патологические зоны глазного дна при определении ранних

проявлений ВМД. Одним из таких офтальмоскопов является сравнительно недавно появившийся на рынке немецкий офтальмоскоп Heidelberg Engineering (Spectralis HRA + OCT) с длиной волны возбуждения флуоресценции – 488 нм.

Неинвазивный метод регистрации аутофлуоресценции позволяет оценить состояние клеток РПЭ у пациентов с макулодистрофией, избрать тактику лечения и сделать прогноз в отношении развития заболевания. Он является одним из наиболее чувствительных современных методов для исследования ранних изменений комплекса РПЭ/мембрана Бруха макулярной зоны. Это дает возможность изучения клиники ВМД и качественной объективной оценки эффективности лечения и профилактики ранних стадий заболевания. Анализ картины аутофлуоресценции глазного дна позволяет оценить состояние, сохранность и жизнеспособность комплекса РПЭ/фоторецепторы (Holz et al., 2001; Holz et al., 2007). Исчезновение же аутофлуоресценции свидетельствует о гибели РПЭ и фоторецепторов и бесперспективности дальнейшего лечения. Помимо диагностики как таковой метод регистрации аутофлуоресценции глазного дна исключительно полезен при скрининге новых лекарственных средств.

Основным источником аутофлуоресценции глазного дна, как уже говорилось, являются ЛГ в клетках РПЭ, точнее флуорофоры, содержащиеся в этих гранулах (Sparrow et al., 2010; Фельдман и др., 2010). В аутофлуоресценцию глазного дна могут также вносить вклад и флуорофоры, накапливающиеся в самих фоторецепторных клетках сетчатки (Bindewald-Wittich et al., 2005; Nguyen-Legros, Hicks, 2000; Логинова и др., 2008).

Большое количество ЛГ накапливается в клетках РПЭ в процессе старения (Feeney-Burns et al., 1984; Boulton et al., 1990). Однако особенно интенсивно они накапливаются при возникновении и развитии дегенеративных заболеваний сетчатки. Речь идет о таких заболеваниях, как моногенное заболевание – болезнь Штаргардта (Allikmets et al., 1997), абиотрофия сетчатки Франческетти (Fundus Flavimaculatus) (Delori et al., 1995), прогрессирующая ВМД (Holz et al., 2001; Robson et al., 2008). Поэтому исследование механизмов образования и превращения комплекса флуорофоров, содержащихся как в ЛГ, так и в фоторецепторных клетках сетчатки, выяснение их спектральных особенностей – спектров поглощения и флуоресценции – представляется важной задачей современной молекулярной физиологии и патологии зрения.

2. Некоторые технические характеристики конфокального лазерного сканирующего офтальмоскопа (Гейдельбергский ретинальный анализатор HRA-2, Гейдельберг, Германия)

Принципиально важно, что в существующем и довольно широко распространенном для регистрации аутофлуоресценции глазного дна офтальмоскопе для возбуждения аутофлуоресценции используется встроенный аргоновый лазер с длиной волны 488 нм. При этом барьерным фильтром отсекается флуоресценция флуоро-

форов с длиной волны менее 500 нм. Узкополосные интерференционные фильтры гасят «мешающие» сигналы. В результате получается монохромное изображение, созданное флуоресценцией собственно флуорофоров глазного дна в области 500 нм и длиннее. Контрастность и четкость изображения обеспечиваются конфокальной сканирующей лазерной системой, позволяющей подавлять рассеянный и отраженный свет от источников, находящихся вне фокальной плоскости. Цифровые изображения сохраняются для дальнейшей обработки и клинического анализа.

Аутофлуоресцентное изображение глазного дна в норме выглядит монотонно серым с черными сосудами и диском зрительного нерва. Сосуды кажутся черными за счет экранирования аутофлуоресценции, а диск зрительного нерва – за счет отсутствия флуорофоров. В макулярной области имеется овальная зона плавного снижения флуоресценции с почти черной фовеолой, что обусловлено наличием в ней макулярного пигмента. При патологии сетчатки более светлые участки глазного дна соответствуют гипераутофлуоресценции, а более темные – гипоаутофлуоресценции. Участки глазного дна, где наблюдается гипоаутофлуоресценция, соответствуют областям с дегенеративными изменениями в РПЭ и сетчатке. Достаточно часто в картине аутофлуоресценции наблюдаются участки гипераутофлуоресценции (Holz et al., 2001; Robson et al., 2008). Это явление практически не имеет экспериментально доказанного объяснения. Предполагается, что повышенное содержание ЛГ в клетках РПЭ не является единственным фактором, приводящим к гипераутофлуоресценции. Увеличение интенсивности флуоресценции может быть обусловлено фотоокислением ЛГ (Kim et al., 2010; Sparrow et al., 2010). Источником гипераутофлуоресценции могут быть и фоторецепторные клетки сетчатки. Так, предполагается, что при некоторых патологиях в результате нарушения фагоцитарных свойств клеток РПЭ в фоторецепторных клетках происходит избыточное накопление бисретиноидов, которые и могут являться источником гипераутофлуоресценции (Schmitz-Valckenberg et al., 2004; Smith et al., 2009; Secondi et al., 2012).

Картина аутофлуоресценции глазного дна, полученная при помощи конфокального лазерного сканирующего офтальмоскопа (HRA-2, Гейдельберг, Германия) позволяет, таким образом, идентифицировать только те флуорофоры, которые поглощают свет в диапазоне возбуждающей длины волны, равной 488 нм, и флуоресцируют в области 500 нм и длиннее. Вместе с тем, становится очевидным (см. ниже), что флуорофоры, поглощающие и испускающие свет в более коротковолновой области спектра, также по-возможности должны быть идентифицированными. Именно такие флуорофоры, появляющиеся в ходе развития старческих и дегенеративных изменений РПЭ и сетчатки, являются весьма (фото)токсичными (Sparrow et al., 2003; Wang et al., 2006; Wu et al., 2010; Yoon et al., 2012). Они представляют существенную опасность и могут служить диагностическими маркерами прогрессирования заболевания. Из этого следует, что конструкция существующих конфокальных лазерных сканирующих офтальмоскопов должна быть изменена, а методика регистрации картины аутофлуоресценции глазного дна усовершенствована. Попытки в этом направлении предпринимаются (Holz et al., 2001, 2007; Schmitz-Valckenberg et al., 2002; Spaide, 2003).

3. Природа флуорофоров, ответственных за аутофлуоресценцию глазного дна

Как известно, фотолиз зрительного пигмента родопсина завершается разрывом ковалентной связи между опсином и полностью-*транс*-ретиналем (ПТР) и высвобождением последнего из хромофорного центра опсина. ПТР высвобождается во внутридисковое пространство фоторецепторного диска наружного сегмента зрительной клетки. Затем он переносится через фоторецепторную мембрану на цитоплазматическую поверхность диска, где восстанавливается до полностью-*транс*-ретинола высокоактивной ретинолдегидрогеназой. В свою очередь, полностью-*транс*-ретинол переносится при помощи ретинол-переносящих белков из наружного сегмента палочки в клетку РПЭ (Palczewski et al., 1994).

При патологии, когда белок-переносчик дефектен, например при болезни Штаргардта (дефектным является белок-переносчик ABCR4), ПТР накапливается в фоторецепторной мембране (Travis, 1998; Островский, 2005; Rozanowska, Sarna, 2005).

При избыточном обесцвечивании родопсина в фоторецепторной мембране также может происходить накопление ПТР. Свободный и неудаленный из фоторецепторной мембраны ПТР может легко взаимодействовать с аминогруппой фосфатидилэтаноламина с образованием основания Шиффа – N-ретинилиден-фосфатидилэтаноламина (АРЕ). Именно этот продукт взаимодействия ПТР с фосфатидилэтаноламином удаляется из фоторецепторной мембраны при помощи АТФ-зависимого белка-переносчика (ABCR) (Weng et al., 1999; Saari, 2000; Lamb, Simon, 2004; Molday et al., 2009; Maeda et al., 2012).

Неудаленный АРЕ может вступать во взаимодействие еще с одной молекулой ПТР, приводя к образованию бисретиноидов, в том числе таких побочных и потенциально опасных продуктов, как N-бис-ретинилиден-фосфатидилэтаноламин – A2-PE (N-bis-retinylidene-phosphatidylethanolamine), дигидро-A2-PE, основания Шиффа между димером ПТР и фосфатидилэтаноламином – ATR-dimer-PE (ATR-dimer-phosphatidylethanolamine conjugate) (Liu et al., 2000; Kim et al., 2007). При взаимодействии двух молекул ПТР с аминогруппами белка (родопсина) может образовываться A2-родопсин (Fishkin et al., 2003). Все эти побочные продукты являются устойчивыми соединениями, и они представляют собой источник накопления бисретиноидов в фоторецепторной клетке (Rozanowska, Sarna, 2005).

В то же время, сам ПТР является эффективным природным фотосенсибилизатором (Harper, Gaillard, 2003; Fu et al., 2003; Liu, Hammand, 2003). По механизму фотосенсибилизированного окисления ПТР способен окислять и белки, и липиды в фоторецепторной мембране. Показано, что он способен повреждать родопсин, межфоторецепторный ретинол-связывающий белок (Островский, Федорович, 1996; Fedorovich et al., 2000), а также мембранный белок-переносчик ABCR (Sun, Nathans, 2001).

До недавнего времени считалось, что при физиологических условиях накопление токсичного и фототоксичного свободного ПТР в наружном сегменте зрительной клетки или не происходит, или является кратковременным. Однако совокуп-

ность накопленных к настоящему времени данных свидетельствует о том, что ПТР способен выступать в роли токсического или фототоксического агента, усугубляющего развитие дегенеративных заболеваний сетчатки (Rozanowska, Sarna, 2005; Masutomi et al., 2012; Maeda et al., 2012). Другими словами, накопление в фоторецепторных клетках свободного ПТР может рассматриваться как фактор риска усугубляющего действия света при развитии различных дегенеративных заболеваний сетчатки (Островский, 2005; Wang et al., 2003).

В процессе эволюции зрительной системы сформировался достаточно эффективный способ защиты от накопления в клетке молекулярных дефектов и, в том числе, побочных продуктов фотолиза родопсина – бисретиноидов. Постоянное обновление фоторецепторных мембран и всего наружного сегмента зрительной клетки (и палочки, и колбочки) позволяет в норме избегать накопления молекулярных дефектов, благодаря чему молекулярная «машинерия» зрения остается эффективной на протяжении всей жизни. Однако вместе с т.н. фагосомами – «отработанными» и фагоцитированными обломками наружных сегментов фоторецепторных клеток, в клетки РПЭ попадают и (фото)токсичные бисретиноиды. В результате неполной лизосомальной деградации фагосом в клетках РПЭ накапливаются недеградабельные ЛГ – «пигмент старости».

Долгое время ЛГ считались инертным побочным продуктом жизнедеятельности клетки РПЭ. Однако, во-первых, была показана способность ЛГ генерировать при действии видимого света активные формы кислорода (Островский и др., 1996; Boulton et al., 1993) и, во-вторых, выявлена явная корреляция между накоплением ЛГ в клетках РПЭ и дегенеративными заболеваниями сетчатки, в том числе ВМД (Boulton et al., 1993, 2004; Brunk, Terman, 2002; Островский, 2005). Не вызывает сомнения, что производные ПТР – бисретиноиды, являются фототоксичными для клеток РПЭ (Suter et al., 2000; Ben-Shabat et al., 2002a; Kim et al., 2006) и что их окисленные формы становятся токсичными и в темноте (Ben-Shabat et al., 2002a, Sparrow et al., 2003; Rozanowska, Sarna, 2005).

ЛГ поглощают свет в видимой, в основном коротковолновой (фиолетово-синей), области спектра, и обладают ярко выраженной флуоресценцией. Флуоресцентные свойства ЛГ обусловлены, в основном, наличием в них конъюгатов ПТР различной природы. Однако хорошо изученным является практически только один флуорофор, т.н. A2E (N-ретинил-N-ретинилиденэтаноламин) – продукт взаимодействия двух молекул ПТР с аминогруппой одного из липидов фоторецепторной мембраны – фосфатидилэтаноламина (PE) (Parish et al., 1998; Ben-Shabat et al., 2002b). A2E образуется из своего предшественника A2PE путем ферментативного гидролиза (рис. 1). Помимо A2E в ЛГ содержится еще около двадцати флуорофоров, являющихся производными ретиналя (Eldred, Katz, 1988; Sparrow et al., 2009). В настоящее время охарактеризованы такие конъюгаты ПТР, как ПТР-димер (ATR-dimer), ПТР-димер этаноламин конъюгат (ATR-dimer-E), ПТР-димер фосфатидилэтаноламин конъюгат (ATR-dimer-PE) (Kim et al., 2007), A2-дигидропиридин-фосфатидилэтаноламин (A2-DHP-PE) и A2-дигидропиридин-этаноламин (A2-DHP-E) (Wu et al., 2009), а также конъюгат ПТР с глицерофосфоэтаноламином (glycerophosphoethanolamine) (A2-GPE) (Yamamoto et al., 2011).

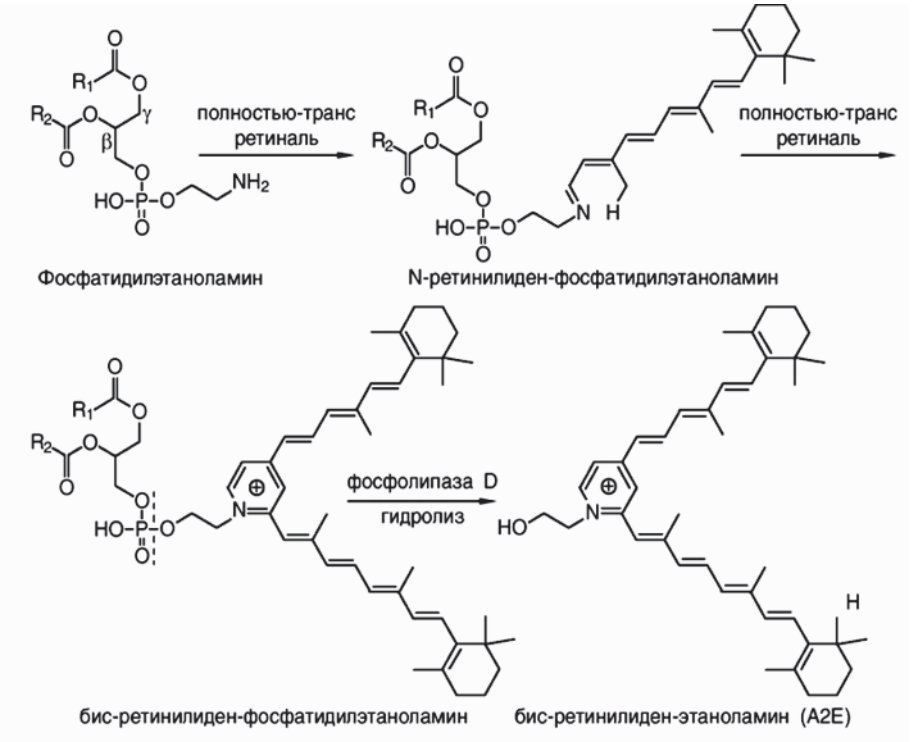


Рис. 1. Последовательность химических реакций, приводящих к образованию молекулы A2E (*N*-ретинил-*N*-ретинилиденэтаноламина) из двух молекул полностью-*транс*-ретиналя и молекулы PE (фосфатидилэтаноламина)

В присутствии кислорода A2E может фотоокисляться с образованием различных окисленных форм (Avalle et al., 2004; Dillon et al., 2004). Окисленные продукты A2E способны оказывать токсическое действие на клеточные структуры уже без участия света (Sparrow et al., 2003; Wang et al., 2006; Wu et al., 2010; Yoon et al., 2012). Эти продукты окисления являются более гидрофильными, чем исходный A2E. Поэтому они могут высвобождаться из ЛГ (Соколов и др., 2005) и перемещаться в цитоплазме клетки РПЭ в другие клеточные органеллы, например в ядро и в митохондрии РПЭ (Донцов и др., 2009). Окисленные формы A2E были обнаружены в ЛГ, выделенных как из старческих глаз человека, так и из РПЭ глаз мышей с мутацией в ABCR-гене, моделирующем болезнь Штаргарда и ВМД (Avalle et al., 2004; Radu et al., 2004, Wielgus et al., 2010). При этом были идентифицированы в РПЭ как мышей, так и человека обе формы продуктов окисления A2E – эпокси- и фуранопроизводные (Jang et al., 2005; Яковлева и др., 2006). Важно подчеркнуть, что образование и накопление окисленных продуктов отражается на спектральных характеристиках ЛГ. Как нами ранее было показано, при действии света (фотоокислении) спектры поглощения и флуоресценции как A2E, так и самих ЛГ сдвигаются в коротковолновую область (Донцов и др., 2005, 2006, 2009; Яковлева и др., 2006, 2009; Фельдман и др., 2010). Очевидно, что неокисленные и окисленные формы

флуорофоров могут вносить различный вклад в картину аутофлуоресценции глазного дна, что следует учитывать при дальнейшем усовершенствовании этого метода.

Изучение состава и спектральных характеристик флуорофоров, их неокисленных и окисленных форм, содержащихся как в ЛГ клеток РПЭ, так и в фоторецепторных клетках сетчатки, является важным как для понимания природы, так и для интерпретации картины аутофлуоресценции глазного дна, меняющейся в ходе старения и на различных стадиях патологического процесса. Такое изучение важно независимо от того, возбуждается АФ при 488 нм или регистрируется в диапазоне 500–600 нм, как это имеет место в существующем гейдельбергском офтальмоскопе, и это тем более важно, если в будущем удастся получать картину АФ при более коротковолновом возбуждении и более коротковолновой регистрации.

4. Образование флуорофоров – продуктов взаимодействия свободного *транс*-ретиналя с аминогруппами белка и липидов в фоторецепторных клетках (исследование *in vitro* на модельных системах)

Избыточное накопление свободного ПТР в фоторецепторной мембране при некоторых патологиях или в случае интенсивного воздействия света приводит к образованию бисретиноидов – продуктов взаимодействия ПТР с аминогруппами фосфатидиэтаноламина и белковых молекул (A2PE и др.). Эти бисретиноиды наряду с флуорофорами ЛГ (A2E и др.) также могут вносить вклад в аутофлуоресценцию глазного дна. Изучение спектральных характеристик бисретиноидов фоторецепторных клеток является не менее актуальным, чем изучение флуорофоров ЛГ в РПЭ. Ситуация избыточного накопления свободного ПТР в фоторецепторных мембранах была промоделирована в экспериментах in vitro (Fishkin et al., 2003, Логинова и др., 2008а,б, 2009).

На рис. 2А представлен спектр поглощения (спектр 3) суспензии наружных сегментов палочек сетчатки (НСП) после темновой инкубации с 10-кратным избытком ПТР в течение 3 суток при 37°С. В этот спектр кроме самого родопсина вносят вклад продукты взаимодействия свободного ПТР с аминогруппами белка и липидов.

Продукты взаимодействия ПТР с аминогруппами родопсина и фосфатидилэтаноламина обладают характерной и сильной флуоресценцией (Ben-Shabat et al., 2002; Jockusch et al., 2004). Ниже представлены данные флуоресцентного анализа этих продуктов при длинах волн возбуждения 350 и 460 нм (рис. 2Б). При возбуждении 350 нм наблюдаются две выраженные полосы с максимумами в области 480 нм и 545 нм, а при возбуждении 460 нм – одна полоса с максимумами в области 540–550 нм. Анализ спектров флуоресценции (табл. 1) позволяет предположить, что образуются три типа соединений: согласно литературным данным, это могут быть непротонированные Шиффовы основания, протонированные Шиффовы основания и продукты вторичного взаимодействия ПТР с Шиффовым основанием (например A2-PE и A2-родопсин).

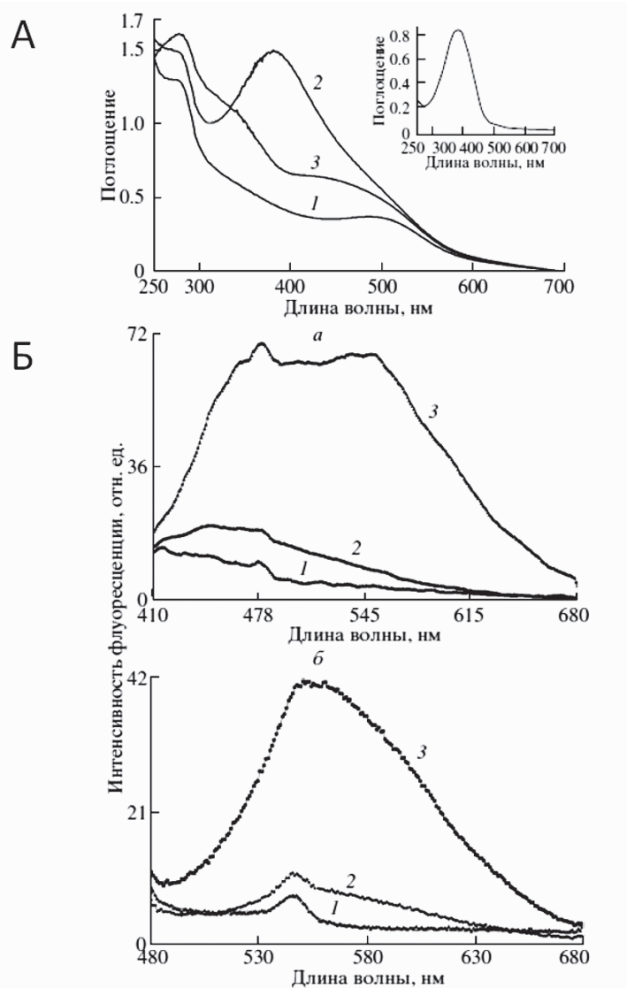


Рис. 2. (А) Спектры поглощения суспензии НСП

1 – Темновая суспензия НСП (характерный спектр поглощения родопсина в фоторецепторной мембране с максимумом при 500 нм); 2 – темновая суспензия НСП в присутствии 10-кратного избытка ПТР (спектр записан сразу после добавления избытка ПТР, максимум при 380 нм характерен для свободного ПТР); 3 – суспензия НСП, после ее инкубированная в темноте с 10-кратным избытком ПТР в течение 3 суток 37° С. Вставка – спектр поглощения ПТР (максимум при 380 нм). (Б) Спектры флуоресценции суспензии наружных сегментов палочек (НСП) при возбуждении 350 нм (а) и 460 нм (б). 1 – Исходная суспензия НСП; 2 – суспензия НСП в присутствии 10-кратного избытка ПТР; 3 – суспензия НСП, инкубированная в присутствии 10-кратного избытка ПТР в течение 3 суток при 37°С (Логинова и др., 2008)

Таблица 1

Продукты модификации родопсина и липидов, образующиеся при инкубации с экзогенным полностью-*транс*-ретиналем в течение 3 суток при 37°С

Спектральные продукты	λ_{max} (поглощение), нм	λ_{max} (испускание), нм
Непротонированные основания Шиффа	355	480
Протонированные основания Шиффа	440	545
А2-производные	335, 460	460, 555

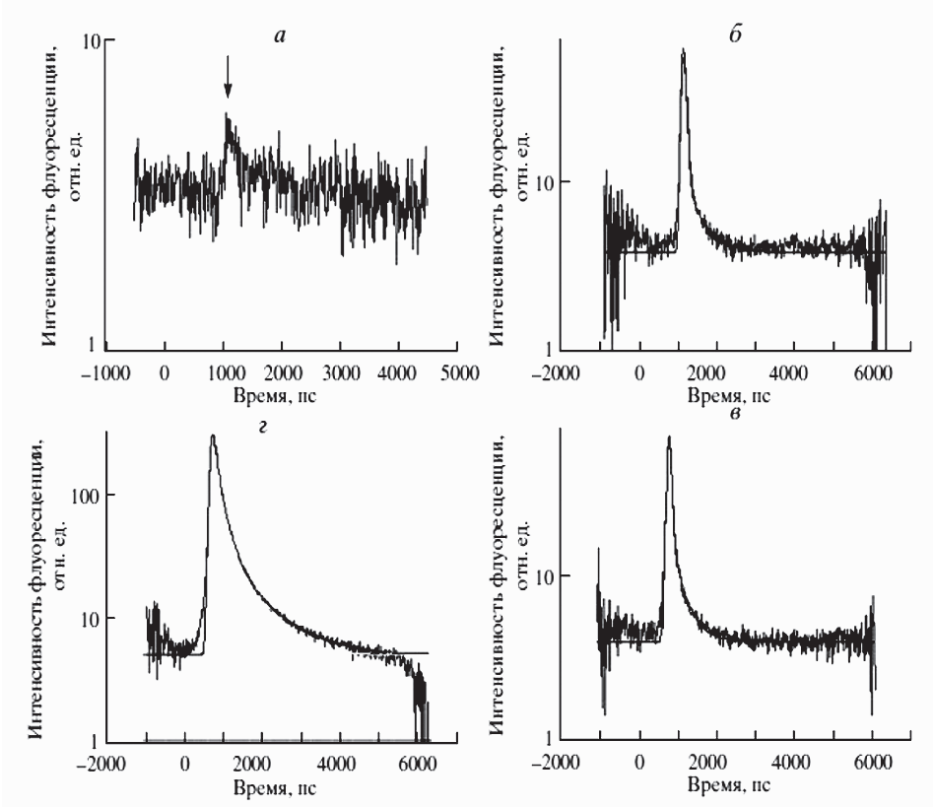


Рис. 3. Кинетика затухания флуоресценции при возбуждении излучением с длиной волны 353 нм а – родопсин в суспензии НСП; б – ПТР в буфере; в – ПТР, добавленный в 10-кратном избытке к суспензии НСП (регистрация сразу после добавления ПТР, до инкубации); г – родопсин, инкубированный с 10-кратным избытком ПТР в течение 3 суток при 37°С (Логинова и др., 2009)

Для сравнительного исследования фотохимических свойств транс-ретиналя и его конъюгатов с родопсином и липидами были зарегистрированы кинетики затухания флуоресценции в пикосекундном диапазоне времени после их возбуждения импульсом длительностью ~20 пс с длиной волны 353 нм (рис. 3). Кинетика затухания флуоресценции ПТР в буфере практически моноэкспоненциальна (τ_1=31±2 пс) и характеризует время жизни возбужденного состояния. Исследование кинетики затухания флуоресценции суспензии наружных сегментов палочек после инкубации с ПТР в течение 3 суток при 37°С показало, что характер кинетической кривой существенно меняется. Наилучшая аппроксимация этой кинетики достигается в 3-экспоненциальном приближении кривой вида:

$$\Phi(t) = \sum_i A_i \exp(-t/\tau_i) \ ,$$

где i – число компонент, А – амплитуды, τ – длительность компонент. Найдено, что τ_1=48±2 пс (22%), τ_2=208±5 пс (48%), τ_3=900±10пс (30%). Наличие трех компонент в кинетике флуоресценции инкубированного образца можно объяснить присут-

ствием как минимум 3 центров свечения. Сопоставление с литературными данными (Takeuchi, Tahara, 1997; Tahara, Hamaguchi, 1995; Bachilo et al., 1996; Harper, Gaillard, 2003) позволяет предположить, что первая компонента (48 пс) принадлежит протонированным основаниям Шиффа, вторая компонента (208 пс) принадлежит, по-видимому, А2-производным ретиналя, а третья компонента (900 пс) – непротонированным основаниям Шиффа.

Таким образом, описанная выше модельная система позволяет предположить, что в ситуации избыточного накопления ПТР в фоторецепторной клетке происходит образование как минимум трех типов продуктов (Логинова и др., 2009). Продукты взаимодействия ПТР с аминогруппами фосфатидилэтаноламина и белковых молекул в фоторецепторных мембранах проявляют достаточно сильные флуоресцентные свойства и могут вносить заметный вклад в аутофлуоресценцию глазного дна, например, при патологиях, вызванных нарушением механизма удаления отработанного ПТР при фотолизе родопсина.

5. Флуорофоры липофусциновых гранул из клеток ретинального пигментного эпителия кадаверных глаз человека

Флуоресцентные свойства ЛГ обусловлены, в основном, наличием в них бисретиноидов – конъюгатов ПТР различной природы. В состав ЛГ входит около 21 флуорофора (Eldred, Katz, 1988; Sparrow et al., 2009). Определение вклада различных флуорофоров в суммарную картину аутофлуоресценции глазного дна является одной из актуальных задач для дальнейшего развития современного неинвазивного метода диагностики дегенеративных процессов в сетчатке и РПЭ (Smith et al., 2005).

Нами были подробно исследованы состав и спектральные свойства флуорофоров, входящих в состав ЛГ, полученных из РПЭ кадаверных глаз человека. При этом состав и спектральные свойства флуорофоров были исследованы в зависимости от возраста доноров кадаверных глаз. Кроме того, в нашем распоряжении были два кадаверных глаза с явными признаками патологии, обнаруженными при их офтальмологическом осмотре. Кадаверные глаза были получены из Глазного тканевого банка ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова на основании действующего Договора между Московским Бюро судебно-медицинской экспертизы и ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова, а также Договора о научном сотрудничестве между ИБХФ РАН и ФГБУ МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова.

5.1. Исследование структуры и флуоресценции одиночной липофусциновой гранулы

Используя метод микроскопии ближнего поля, нами было исследовано распределение флуоресценции в одиночных ЛГ (Петрухин и др., 2005). На рис. 4А показан профиль высоты единичной гранулы и отмечены шесть точек, в которых произво-

дилась регистрация спектров флуоресценции. Все точки находились в центральной части гранулы, расстояние между которыми составляло от 0,5 до 3,5 мкм. Как видно из рисунка, в точках 1, 2 и 3 спектры флуоресценции практические одинаковые как по форме, так и по интенсивности. Максимум этих спектров находится в области 575 нм. В точке 6 регистрируется спектр такой же формы, но его интенсивность почти на порядок меньше. В точке 5 никакой флуоресценции зарегистрировано не было. В точке 4 был зарегистрирован спектр с незначительной интенсивностью с максимумом в области 675 нм. Эти данные ясно свидетельствуют о неоднородном распределении флуорофоров в единичной ЛГ.

В этих же опытах было продемонстрировано обесцвечивание флуорофоров при действии на ЛГ видимого света. На рис. 4Б показано падение интенсивности флуоресценции при длительном облучении скоплений ЛГ зеленым светом (длина волны 532 нм). Возбуждение осуществлялось через зонд микроскопа ближнего поля. Спектры флуоресценции регистрировали после непрерывного облучения нарастающими дозами: от 0 до $24 \cdot 10^9$ Дж/см^2. Как видно из рисунка, с увеличением дозы интенсивность флуоресценции значительно падает. Более того, происходит некоторое изменение формы спектра флуоресценции. Эти данные свидетельствуют о том, что под действием излучения на длине волны 532 нм в ЛГ происходит обесцвечивание флуорофоров, в результате чего образуются продукты фотоокисления, поглощающие свет в спектральной области короче 420 нм (Яковлева и др., 2009). Согласно электронно-микроскопическим данным, ЛГ гомогенна (Schraermeyer et al., 1999). Однако данные атомно-силовой микроскопии указывают на то, что гранула состоит из более мелких агрегированных частиц. Не исключено, что это «сшитые» нерастворимые белки, из которых, согласно данным химического анализа, на 30–70% состоит гранула (Brunk et al., 2002).

Таким образом, и микроскопия ближнего поля, и атомно-силовая микроскопия свидетельствуют о неоднородной структуре ЛГ. Дальнейшие ультраструктурные, фото- и биохимические исследования необходимы для понимания процесса биогенеза ЛГ в клетках РПЭ в норме и, особенно, при патологии.

Как известно, при возбуждении синим светом ЛГ сильно флуоресцируют в желтой области спектра ($\lambda_{макс} \approx 600$ нм) (Delori et al., 1995). Считается, что за эту флуоресценцию ответственен в основном A2E и/или изо-A2E (Ben-Shabat et al., 2002b; Schmitz-Valckenberg et al., 2002). Помимо A2E в ЛГ присутствуют еще несколько флуорофоров, поглощающих в синей области спектра. В наших экспериментах четко проявилась неоднородность флуоресценции ЛГ. Более того, далеко не все гранулы при возбуждении 410 нм флуоресцировали. Оказалось, что даже во флуоресцирующей грануле флуоресценция регистрировалась только в отдельных ее областях. Также было показано, что при длительном облучении видимым светом (длина волны 532 нм) флуоресценция ЛГ существенно падает. Это может означать, что флуорофор (или флуорофоры), поглощающий свет в области 410 нм, разрушается и переходит в продукты, поглощающие в более коротковолновой области спектра. Изменение формы спектра может быть обусловлено наличием или появлением в ЛГ других, отличных от A2E, флуорофоров. Что касается обесцвечивания флуорофоров ЛГ и образования коротковолновых продуктов фотоокисления,

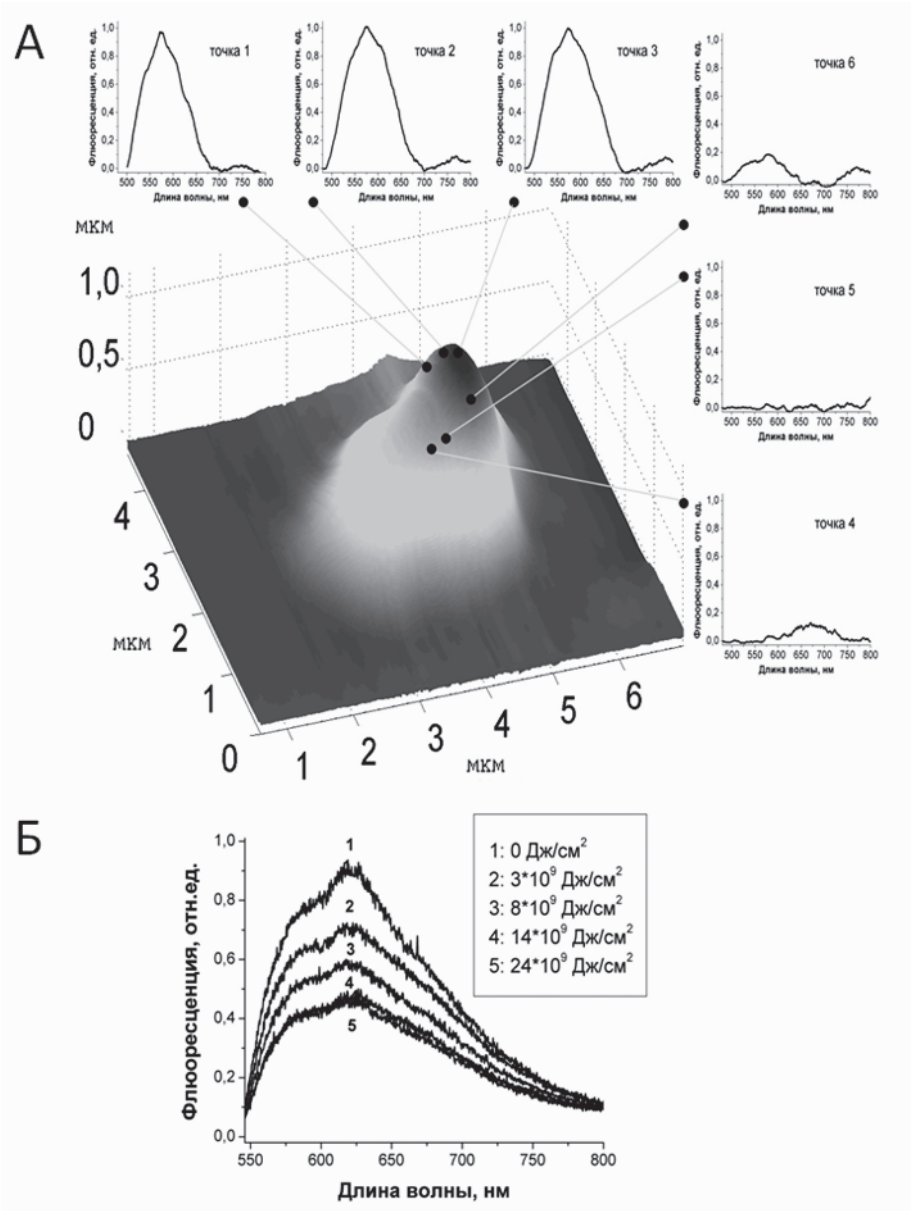


Рис. 4. (А) Топография единичной ЛГ, полученная при помощи микроскопа ближнего поля
Отмечены точки, в которых производилась регистрация спектров флуоресценции, и показаны соответствующие спектры флуоресценции. (Б) Спад интенсивности флуоресценции при длительном облучении ЛГ на длине волны 532 нм (Петрухин и др., 2005)

то действительно, *in vitro* при облучении A2E синим светом показано появление его эпокси-форм. Основные продукты фотоокисления – это 7,8,7′,8′-бис-эпоксид и относительно стабильный оксид 5-8 5’-8’-бис фураноида (Ben-Shabat et al., 2002a; Dillon et al., 2004; Яковлева и др., 2006). Повышенный синтез A2E и его переход

при действии света в продукты окисления – эпоксиды, были показаны и в опытах *in vivo* – в сетчатке и РПЭ нокаутных мышей (abcr$^{-/-}$), для которых характерно накопление избытка ЛГ в клетках РПЭ (Radu et al., 2004). Более того, продукт окисления A2E (моно-эпоксид A2E) обнаружен в ЛГ РПЭ глаза человека (Avalle et al., 2004). Обесцвечивание ЛГ и образование фотоокисленных продуктов может объяснять феномен усугубляющего действия света при развитии дегенеративных заболеваний сетчатки.

5.2. Спектральные характеристики флуорофоров липофусциновых гранул

Считается, что A2E вносит основной вклад в суммарную картину аутофлуоресценции глазного дна (Ben-Shabat et al., 2002b; Schmitz-Valckenberg et al., 2002). Вопрос о вкладе других флуорофоров в картину аутофлуоресценции глазного дна остается открытым. Вполне вероятно, что при старении, при разных формах дегенеративных заболеваний сетчатки и РПЭ и на различных стадиях патологического процесса содержание флуорофоров в ЛГ или их соотношение может меняться. Так, например, гипераутофлуоресценция при некоторых патологиях может быть вызвана повышенным содержанием продуктов фотоокисления A2E (Sparrow et al., 2010), которые токсичны и в отсутствие света (Sparrow et al., 2003; Wang et al., 2006; Wu et al., 2010; Yoon et al., 2012).

Спектральные свойства отдельных флуорофоров (или их групп) и оценка их вклада в суммарный спектр флуоресценции ЛГ были исследованы нами при помощи методов флуорометрии, спектрофотометрии, ВЭЖХ и микроскопии ближнего поля. Для качественной оценки флуорофоров ЛГ были зарегистрированы спектры возбуждения флуоресценции при эмиссии на 335, 450 и 500 нм (Фельдман и др., 2010). Спектр возбуждения с флуоресценцией на 335 нм имеет максимум в области 280 нм. Скорее всего, он принадлежит белковой составляющей ЛГ – флуоресценции триптофана (White, 1959). Спектры возбуждения с флуоресценцией на 450 и 500 нм имеют максимумы в области 270, 350 и 450 нм. Можно предположить, что коротковолновый максимум в области 270 нм принадлежит окисленным формам производных ПТР (Jang et al., 2005), а максимумы в области 350 и 450 нм принадлежат производным ПТР, таким как, например, A2E и ПТР-димер (Sparrow et al., 2012). При этом существенный вклад в суммарный спектр флуоресценции вносят продукты, поглощающие в ультрафиолетовой области. В силу спектральных характеристик хрусталика и других внутриглазных светофильтров возбуждать эти продукты в ситуации in vivo не представляется возможным. Исследовать in vivo их можно было бы в тех редких случаях, когда у пациента имплантирована бесцветная УФ-поглощающая интраокулярная линза. Такие случаи в офтальмологической клинической практике встречаются. При регистрации картины аутофлуоресценции глазного дна у таких пациентов оценка вклада коротковолновых продуктов могла бы дать важную диагностическую информацию о патогенезе дегенеративных заболеваний сетчатки.

На рис. 5А представлены спектры поглощения суспензии ЛГ в фосфатном буфере (1) и хлороформного экстракта из ЛГ (2). Видно, что хлороформная фракция содержит вещества с максимумами поглощения в области 280 нм, 340 нм и 430 нм. Методом ВЭЖХ были определены спектральные характеристики отдельных компонентов хлороформного экстракта из ЛГ. На рис. 5Б представлена хроматограмма хлороформного экстракта ЛГ при детектировании на длине волны

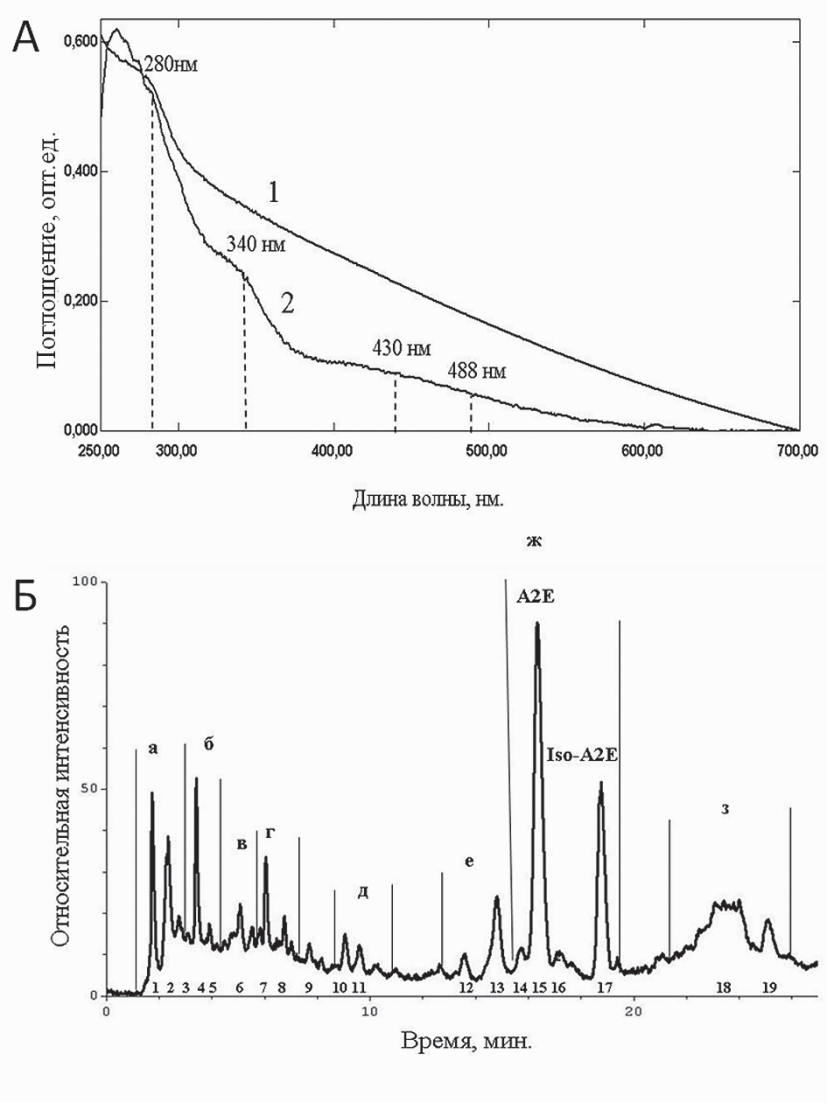


Рис. 5. (А) Спектры поглощения суспензии ЛГ в фосфатном буфере (1) и хлороформного экстракта ЛГ (2). (Б) Хроматограмма хлороформного экстракта из ЛГ. Детекция на длине волны 430 нм.

Вертикальными линиями ограничены группы пиков, которые собирались в виде отдельных фракций, для определения спектральных характеристик флуорофоров в экстракте. Эти фракции обозначены буквами /а-з/ (вверху хроматограммы) (Яковлева и др., 2010)

430 нм. Видно, что образец содержит довольно большое количество компонентов. Нами были идентифицированы A2E (пик № 15), iso-A2E (пик № 17), а также окисленные формы A2E (пики №№ 12 и 13). Природа пиков (1-11) с меньшими временами удерживания не известна. Аналогичные пики появляются на хроматограмме при облучении синтетического A2E белым светом в течение 2 часов (Фельдман и др., 2010). Вероятнее всего – это продукты (фото)окисления и фотодеградации A2E (Wang et al., 2006; Kim et al., 2010; Yoon et al., 2012). Фракции 18 и 19 могут содержать такие производные ПТР, как A2-DHP-PE и A2-DHP-E (Wu et al., 2009, Sparrow et al., 2010), ATR-dimer, ATR-dimer-E и ATR-dimer-PE (Kim et al., 2007), а также A2-GPE (Yamamoto et al., 2011).

Для определения спектральных характеристик детектируемых веществ нами были отобраны фракции /а-з/ и зарегистрированы их спектры поглощения. Доминирующими продуктами по поглощению в видимой области спектра (400–500 нм) являются A2E (пик № 15), iso-A2E (пик № 17) и окисленные формы A2E (фракция /е/, пики 12 и 13). Фракции /а-д/ в большей степени поглощают в ультрафиолетовой области и в меньшей степени – в области 400 нм. Фракция /з/ состоит из группы веществ, поглощающих как в коротковолновой области спектра (в области 300 нм), так и в длинноволновой (в области 500–600 нм).

Полученные нами результаты указывают на то, что в суммарную картину аутофлуоресценции глазного дна могут вносить вклад довольно большое количество флуорофоров, представляющих собой конъюгаты ПТР различной природы.

5.3. ВЭЖХ-анализ синтетического A2E и продуктов его облучения

Как уже отмечалось выше, начальные пики при хроматографическом анализе хлороформного экстракта из ЛГ могут быть продуктами фотоокисления и фотодеградации A2E (Фельдман и др., 2010). Для определения природы этих продуктов были изучены продукты фотоокисления и фотодеградации A2E на модельной системе. Облучение синтетического A2E полным видимым светом приводит к его фотоокислению и образованию новых продуктов (рис. 6). Спектр поглощения раствора A2E в ацетонитриле (кривая 1) имеет два характерных максимума в области 330 и 435 нм. После облучения раствора A2E видимым светом в течение 2 часов оба максимума в области 330 и 435 нм значительно уменьшаются, и в то же время появляется более коротковолновый максимум в районе 280 нм (кривая 2). Можно предположить, что происходит образование новых фотоокисленных продуктов A2E.

Для выяснения природы продуктов фотоокисления A2E был проведен масс-спектрометрический анализ растворов синтетического A2E в ацетонитриле до и после облучения (Яковлева и др., 2006) (рис. 7). Показано, что после облучения помимо основного пика с отношением M/Z 592 (M+), соответствующего неокисленной форме молекулярного иона A2E, появляются новые пики с M/Z 608, 624, 640 и 656, каждый из которых отличается от предыдущего по массе на 16 и соответствует окисленным формам A2E. По мере увеличения времени облучения количество

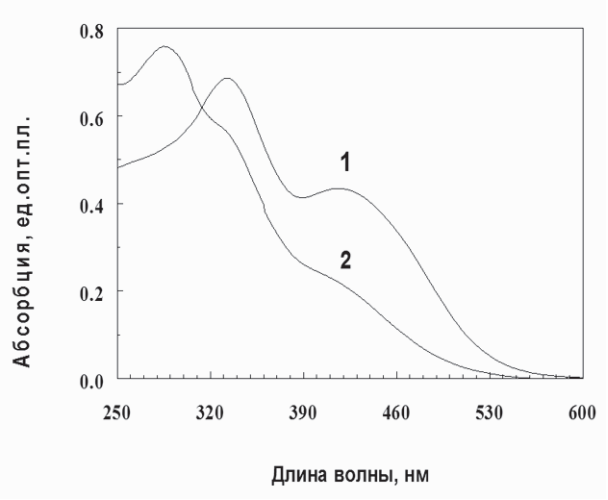


Рис. 6. Спектры поглощения синтетического A2E в ацетонитриле
Кривая 1 до облучения видимым светом, кривая 2 после облучения видимым светом (Яковлева и др., 2006)

окисленных форм A2E растет по отношению к исходной неокисленой форме, о чем свидетельствует относительное увеличение интенсивности пиков с M/Z 608, 624, 640 и 656 по отношению к пику с M/Z 592. Образование нескольких новых окисленных форм A2E хорошо согласуется с данными, полученными методом ВЭЖХ-анализа. Также была проведена идентификация отдельных пиков в масс-спектре с помощью индуцированной столкновениями диссоциации (CID). Основываясь на результатах этих данных, можно утверждать, что в растворе облученного A2E присутствуют как эпокси, так и фураноидные продукты окисления A2E.

Мы провели сравнительный ВЭЖХ-анализ синтетического A2E и продуктов его облучения (рис. 8). Исследование раствора A2E до и после облучения показало, что при фотоокислении A2E образуются, по крайней мере, два основных новых продукта (см. рис. 8Б, пики оху-A2E). Не исключено также, что каждый из них может представлять собой смесь изомеров, или очень близких по своим свойствам веществ. На фоне образования этих новых продуктов наблюдается снижение количества A2E, что является еще одним доводом, подтверждающим образование этих новых продуктов в результате химических реакций A2E. На рис. 8 (А и Б – 1) представлены хроматограммы с детектированием по поглощению на длине волны 430 нм. На рис. 8 (А – 1) представлены данные ВЭЖХ-анализа синтетического A2E. Относительное содержание A2E и его изоформ в исследуемом образце составляет около 87% (табл. 2). После облучения этого образца белым светом в течение 2 часов на хроматограмме (рис. 8, Б – 1) появляются новые пики (оху-A2E), соответствующие окисленным формам A2E, идентифицированным в работе (Яковлева и др., 2006), а также других продуктов фотоокисления и фотодеградации A2E, детектируемых на более коротких временах удерживания. Как видно из табл. 2, относительное содержание A2E и его изоформ уменьшается до 10%.

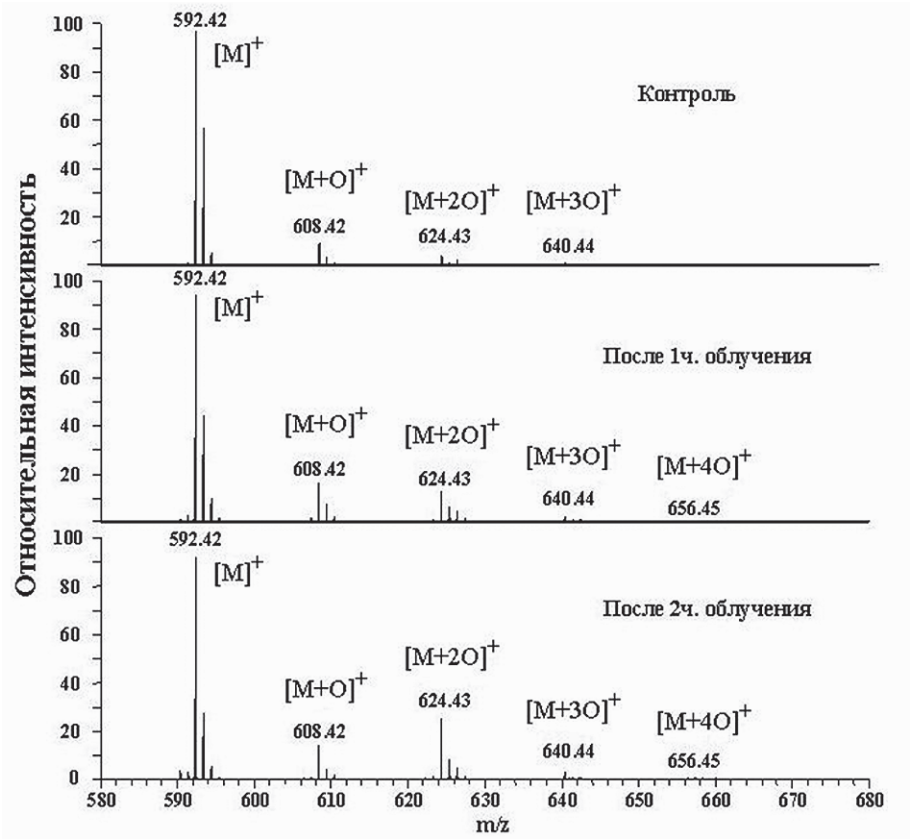


Рис. 7. Масс спектры A2E до и после облучения. $(M)^+$ – основной пик A2E, $(M+O)^+$, $(M+2O)^+$, $(M+3O)^+$ $(M+4O)^+$ – пики, соответствующие моно-, бис-, три-, тетра-окисленным продуктам A2E (Яковлева и др., 2006)

На хроматограммах с детектированием по поглощению можно условно выделить три группы детектируемых веществ в хлороформном экстракте (см. рис. 8 А и Б – 1). Первая группа – это вещества ($A2E_{ox,deg}$), которые детектируются на самых ранних временах, включая продукты оху-A2E. Мы предполагаем, что эти вещества могут быть продуктами фотоокисления и фотодеградации A2E и ПТР-димера. Из этой группы мы идентифицировали продукты, обозначенные на рис. 8 (А и Б – 1) как оху-A2E. Согласно масс-спектрометрическому анализу, эти продукты представляют собой эпокси и фураноидные продукты окисления A2E, образованные при взаимодействии бисретиноида с одним или двумя атомами кислорода (Яковлева и др., 2006). Вещества второй группы – это A2E и iso-A2E (Parish et al., 1998; Яковлева и др., 2006). В состав третьей группы ($A2E_{mod}$) могут входить бисретиноиды, такие как ПТР-димер, ПТР-димер-E, A2-DHP-E, A2-GPE (Kim et al., 2007; Wu et al., 2009; Sparrow et al., 2012; Yamamoto et al., 2012).

Результаты ВЭЖХ-анализа при возбуждении флуоресценции на длине волны 430 нм и детектировании эмиссии при 500 и 600 нм представлены на рис. 8 (А и

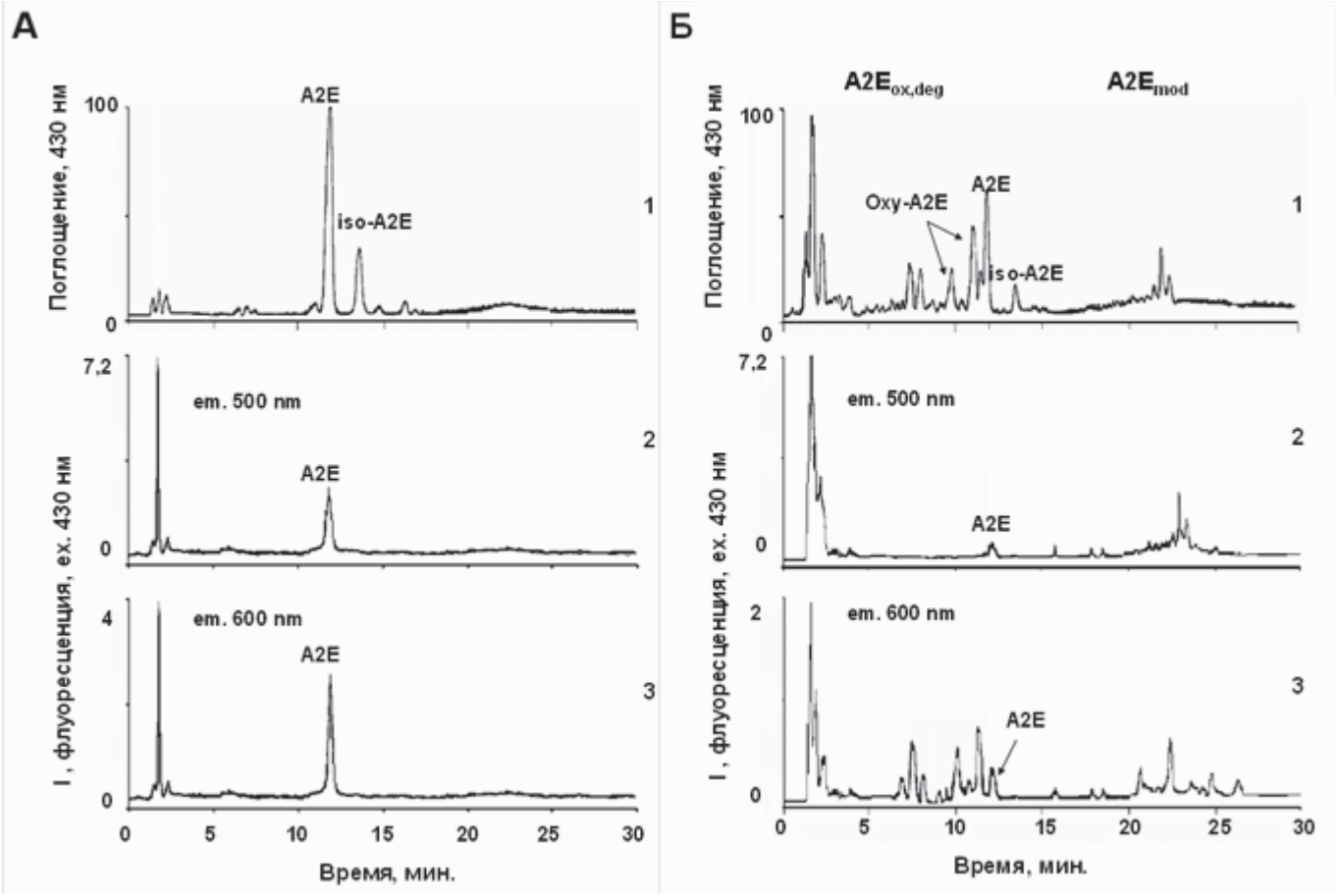


Рис. 8. ВЭЖХ-анализ синтетического A2E до облучения (А) и после облучения 2 часа белым светом (Б)

1 – Хроматограммы по поглощению, детектирование на длине волны 430 нм; 2 и 3 – хроматограммы по флуоресценции, возбуждение флуоресценции на длине волны 430 нм, детектирование эмиссии на длине волны 500 нм (2) и 600 нм (3)

Таблица 2

Относительное содержание A2E, iso-A2E, и продуктов их фотоокисления и фотодеградации до и после облучения в течение 2 часов белым светом*

Синтетический A2E	Группы пиков (%)		
	$A2E_{ox,deg}$	A2E, iso-A2E	$A2E_{mod}$
А – 1, темновой A2E	6,72±0,12	86,80±5,21	6,48±0,23
В – 1, облученный A2E, 2 часа	65,61±4,32	10,11±0,71	24,33±1,05

* Данные рассчитаны из хроматограмм, представаленных на рис. 8 (А и Б – 1).

Б – 2 и 3, соответственно). Следует отметить, что интенсивность флуоресценции необлученного A2E по сравнению с его поглощением существенно меньше. Интересно отметить, что iso-A2E практически не проявляет флуоресцентных свойств. На хроматограммах с флуоресцентным анализом продуктов облучения A2E также детектируется появление новых пиков (см. рис. 8Б – 2 и 3).

5.4. Компонентный спектральный ВЭЖХ-анализ хлороформного экстракта ретинального пигментного эпителия

Для проведения сравнительного анализа флуоресцентных свойств отдельных флуорофоров был получен суммарный хлороформный экстракт РПЭ из 5–7 кадаверных глаз доноров, близких по возрасту и без видимых патологических признаков в РПЭ.

ВЭЖХ-анализ был проведен на двух последовательно соединенных детекторах – спектрофотометрическом и флуоресцентном. Количество одного образца было достаточным для тестирования поглощения отдельных продуктов в смеси на разных длинах волн и проведения флуоресцентного анализа при разных длинах волн возбуждения флуоресценции и эмиссии. Другими словами, во всех хроматограммах, полученных при детектировании продуктов в смеси, содержатся данные о составе и относительном флуоресцентном вкладе отдельных компонентов одного и того же образца. На рис. 9 представлены хроматограммы с детектированием по поглощению (А, Б и В – 1) и по флуоресценции (А, Б и В – 2 и 3). Детектирование по поглощению проводили на длинах волн 340, 430 и 510 нм (А, Б и В, соответственно), где поглощает большинство бисретиноидов (Lamb, Simon, 2004; Kim et al., 2007; Wu et al., 2009; Sparrow et al., 2010; Yamamoto et al., 2011). Флуоресценцию возбуждали на этих же длинах волн, а эмиссию детектировали для А и Б эксперимента при 500 и 600 нм, для В эксперимента – при 600 и 650 нм. Как видно из рисунка, наибольшая интенсивность поглощения всех детектируемых компонентов хлороформного экстракта наблюдается на длине волны 340 нм (А – 1). На длине волны 430 нм интенсивность падает в среднем в 2 раза (Б – 1), а на длине волны 510 нм – примерно в 4 раза (В – 1) по сравнению с первой хроматограммой с детектированием на длине волны 340 нм. На всех хроматограммах можно выделить три группы пиков: первая группа – $A2E_{ox,deg}$ (продукты фотоокисления и фотодеградации A2E), вторая – A2E и iso-A2E, третья группа – $A2E_{mod}$ (продукты модификации

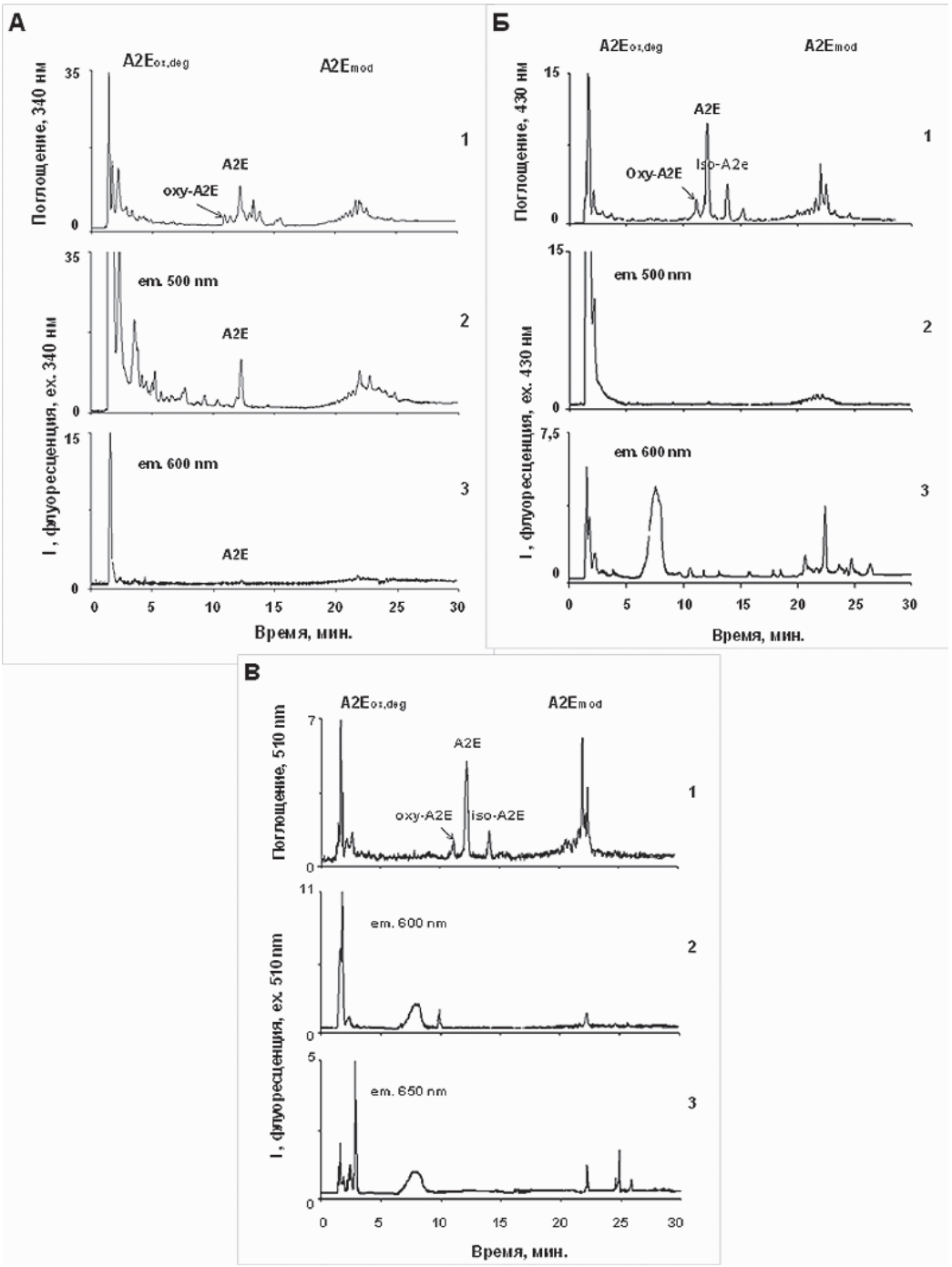


Рис. 9. ВЭЖХ-анализ хлороформного экстракта из РПЭ кадаверных глаз человека
Хроматограммы по поглощению (А, Б и В – 1) и по флуоресценции (А, Б и В – 2 и 3)

Таблица 3

Относительное содержание флуорофоров липофусциновых гранул в хлороформном экстракте из ретинального пигментного эпителия кадаверных глаз человека*

Длина волны детектирования, нм	Группа $A2E_{ox,deg}$ (%)	Группа A2E и iso-A2E (%)	Группа $A2E_{mod}$ (%)
340 (А)	57,48 ± 3,21	18,27 ± 1,22	24,24 ± 0,12
430 (Б)	40,01 ± 2,02	28,31 ± 1,01	31,68 ± 1,31
510 (В)	28,84 ± 0,98	25,15 ± 0,75	46,01 ± 1,45

*Данные рассчитаны из хроматограмм, представаленных на рис. 9 (А, Б и В, хроматограммы 1).

A2E). Можно отметить, что с увеличением длины волны детектирования уменьшается и количество детектируемых продуктов в каждой группе. В табл. 3 представлены данные по относительному содержанию компонентов каждой из групп в смеси на разных длинах волн детектирования по поглощению. Как можно видеть из табл. 3, относительный вклад A2E и iso-A2E в суммарное поглощение всех детектируемых продуктов в хлороформном экстракте РПЭ на разных длинах волн детектирования (340, 430, 510 нм) является наименьшим по сравнению с остальными группами.

При анализе хроматограммы, полученной при детектировании флуоресценции (возбуждение длинами волн 340, 430 и 510 нм) (см. рис. 9А, В и С – 2 и 3), видно, что интенсивность флуоресценции группы пиков $A2E_{ox,deg}$ несравнимо выше, чем интенсивность всех остальных компонентов хлороформного экстракта РПЭ, независимо от длины волны возбуждения флуоресценции и длины волны детектирования эмиссии. Относительный вклад группы детектируемых продуктов $A2E_{ox,deg}$ в суммарную флуоресценцию всех детектируемых продуктов составляет в среднем 81–96% (табл. 4). Как и в случае поглощения, наибольшая интенсивность эмиссии наблюдается на хроматограмме при возбуждении флуоресценции длиной волны 340 нм (см. рис. 9А – 2). Интенсивность флуоресценции этой группы детектируемых веществ на длине волны 500 нм составляет около 96% (см. табл. 4) от общего вклада всех компонентов, в то время как A2E – только около 1%. Этот результат хорошо коррелирует с нашей более ранней работой (Яковлева и др., 2010). При возбуждении флуоресценции длиной волны 430 и 510 нм и детектировании эмиссии на длинах волн 500, 600 и 650 нм флуоресценция A2E и его изоформ практически не регистрируется. При возбуждении флуоресценции длинами волн 430 и 510 нм интенсивность эмиссии всех детектируемых продуктов, как и их поглощение, достаточно резко падает. Как уже отмечалось выше, основной вклад в суммарную флуоресценцию вносит эмиссия группы $A2E_{ox,deg}$ (см. рис. 9Б и В – 2, 3, табл. 4). Следует отметить, что при детектировании эмиссии на длине волны 600 и 650 нм (см. рис. 9 А – 2, Б – 2 и 3) можно наблюдать достаточно широкий и интенсивный пик (возможно, это несколько продуктов), появляющийся на 6–7-й минуте хроматографирования. При этом на хроматограммах, детектируемых по поглощению на

Таблица 4

Относительный вклад интенсивности флуоресценции групп флуорофоров в хлороформном экстракте из ретинального пигментного эпителия кадаверных глаз человека в общую флуоресценцию всех детектируемых флуорофоров*

Эмиссия, нм	Группа $A2E_{ox,deg}$ (%)	Группа A2E и iso-A2E (%)	Группа $A2E_{mod}$ (%)
A (возбуждение 340 нм)			
500	96,17 ± 3,46	0,74 ± 0,03	2,61 ± 0,23
600	81,53 ± 2,13	1,97 ± 0,01	16,50 ± 1,02
B (возбуждение 430 нм)			
500	97,26 ± 3,67	0,08 ± 0,01	2,66 ± 0,11
600	81,24 ± 1,05	1,67 ± 0,14	17,08 ± 1,02
C (возбуждение 510 нм)			
600	96,27 ± 2,37	0,99 ± 0,04	2,72 ± 0,24
650	91,97 ± 1,29	-	8,03 ± 0,71

* Данные рассчитаны из хроматограмм представаленных на рис. 9 (А, Б и В, хроматограммы 2 и 3).

разных длинах волн в этом временном диапазоне, этот продукт или несколько продуктов детектируются на уровне шумов (см. рис. 9Б и В – 1).

Таким образом, анализ флуоресцентных свойств отдельных компонентов в хлороформном экстракте РПЭ при ВЭЖХ-анализе показал, что наибольший относительный вклад в суммарную флуоресценцию вносят флуорофоры группы $A2E_{ox,deg}$. Скорее всего, эти компоненты являются продуктами фотоокисления и фотодеградации A2E и ПТР-димера.

При сопоставлении хроматограммы ВЭЖХ-анализа фотоокисленного A2E (см. рис. 8Б) с аналогичными данными ВЭЖХ-анализа хлороформного экстракта РПЭ (см. рис. 9Б) можно отметить аналогию в детектируемых продуктах групп $A2E_{ox,deg}$ и $A2E_{mod}$. Другими словами, можно сказать, что все вновь появляющиеся после облучения видимым светом A2E продукты являются продуктами фотоокисления, фотодеградации и, возможно, модификации A2E (например ПТР-димер). Мы не можем обсуждать количественные характеристики и истинные спектральные свойства этих продуктов, так как для большинства из них не известны коэффициенты экстинкции. Также мы не можем описать истинный вклад каждого компонента в суммарную флуоресценцию всей смеси, так как флуоресцентные свойства молекул зависят от их микроокружения. Экстрагируя флуорофоры из РПЭ, мы тем самым нарушаем это микроокружение. Вполне возможно, что флуоресцентные свойства отдельных флуорофоров ЛГ могут существенно меняться при их экстрагировании в хлороформ, а далее и при разделении на хроматографической колонке. Несмотря на то что по количественным характеристикам A2E и является доминирующим соединением, его вклад как флуорофора в суммарную флуореценцию хлороформного экстракта (in vitro) незначителен. Не исключено, что вклад A2E в картину аутофлуоресценции глазного дна *in vivo* также может быть менее существенным, чем это считается в настоящее время.

Относительное содержание флуорофоров в хлороформном экстракте из РПЭ кадаверных глаз человека без признаков патологии в зависимости от возраста доноров

В данной серии экспериментов было получено и исследовано 42 индивидуальных образца суспензии клеток РПЭ, выделенных из кадаверных глаз без признаков патологии от доноров в возрастном диапазоне от 17 до 78 лет. Для каждого образца был зарегистрирован спектр флуоресценции при возбуждении длиной волны 430 нм. Независимо от возраста доноров максимумы спектров флуоресценции суспензии клеток РПЭ находились в области 575±15 нм (данные не представлены). Из каждого образца суспензии клеток РПЭ был получен хлороформный экстракт. ВЭЖХ-анализ был проведен с детектированием по поглощению на длине волны 430 нм. На рис. 10А представлена типичная хроматограмма, полученная при ВЭЖХ-анализе хлороформного экстракта РПЭ индивидуального кадаверного глаза без визуально наблюдаемой патологии. Пики и/или группы пиков 1–5 – это продукты фотоокисления и фотодеградации A2E, пики 6 и 8 – A2E и изо-A2E, соответственно, группа пиков 11 может соответствовать продуктам модификации A2E, идентифицированным в работах (Kim et al., 2007; Wu et al., 2009; Sparrow et al., 2012; Yamamoto et al., 2012).

Для статистической обработки полученных результатов данные по близким возрастам объединяли в шесть групп (1, 2, 3, 4, 6 и 8). Из данных ВЭЖХ-анализа в исследуемых хлороформных экстрактах РПЭ было определено относительное содержание отдельных флуорофоров и/или групп флуорофоров. На рис. 10Б (серые столбцы) и в табл. 5 представлены результаты этого анализа. Из диаграммы хорошо видно, что с увеличением возраста донора увеличивается относительное содержание как самого A2E (пик 6), так и продуктов его фотоокисления и фотодеградации (пики/группы пиков 1–5). Непонятным является феномен, обнаруженный нами в различных экспериментах, а именно: резкое падение относительного содержания изо-формы A2E в хлороформном экстракте (пик 8) с увеличением возраста донора. Не исключено, что в ЛГ эта изомерная форма A2E легче подвергается окислению и деградации. Следует отметить, что возрастное увеличение относительного содержания большинства продуктов, как самого A2E, так и продуктов его фотоокисления и фотодеградации, носит практически линейный характер (см. рис. 10Б). Однако соотношение $A2E_{ox,deg}$/A2E + iso-A2E при этом увеличивается с 0,69±0,03 до 1,32±0,04 (см. рис. 10В, табл. 6). Другими словами, относительное содержание продуктов фотоокисления и фотодеградации A2E с возрастом увеличивается. Не исключено, что этот феномен соотносится с патогенезом ВМД.

Таким образом, можно предположить, что зависимое от возраста повышение интенсивности аутофлуоресценции глазного дна без признаков патологии обусловлено не только, а может быть и не столько ростом относительного содержания A2E, сколько увеличением относительного содержания продуктов его фотоокисления и фотодеградации.

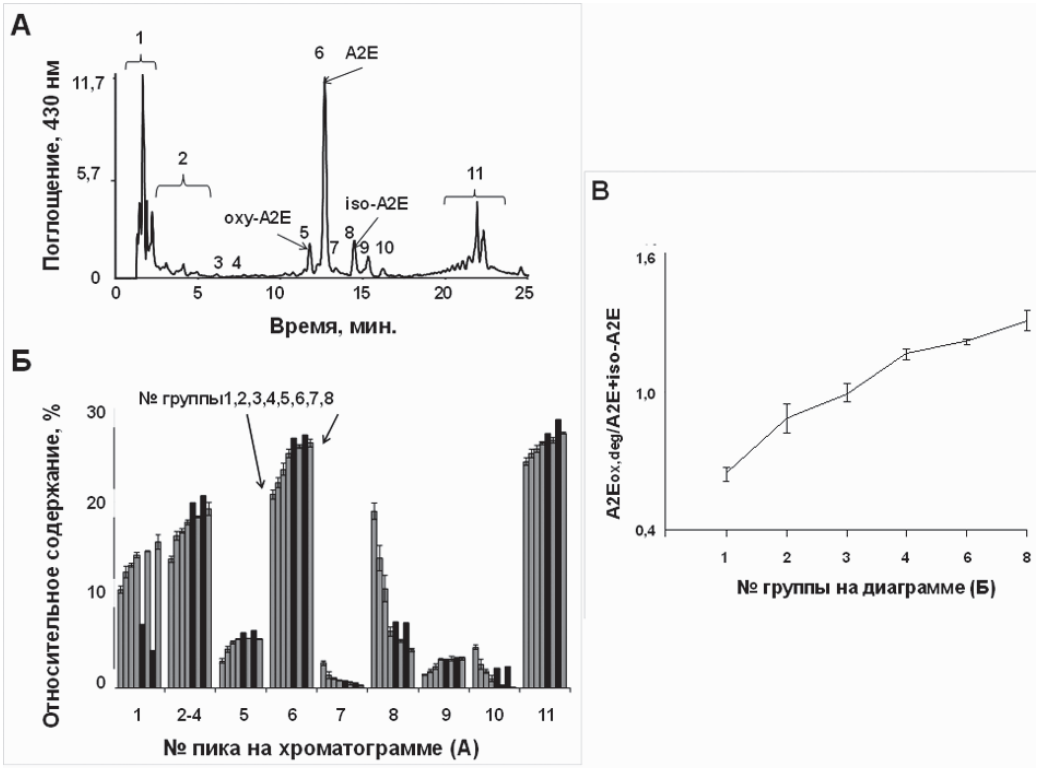


Рис. 10. Относительное содержание флуорофоров ЛГ в хлороформном экстракте из РПЭ индивидуального кадаверного глаза человека без визуализированной патологии и в двух случаях с признаками ВМД

А: ВЭЖХ-анализ хлороформного экстракта из РПЭ индивидуального кадаверного глаза (донор 51 год, норма). Детекция по поглощению на длине волны 430 нм. 1–5 – $A2E_{ox,deg}$; 6 и 8 – A2E и iso-A2E, соответственно; 11 – $A2E_{mod}$ Б: Диаграмма относительного содержания флуорофоров или их групп. По оси абсцисс отложены номера пиков, представленных на хроматограмме (А), по оси ординат – относительное содержание флуорофоров или их групп в хлороформном экстракте (%). Серые столбцы – норма, черные – патология. Столбцы обозначают группы близких по возрасту доноров, слева направо: №1: 17 (n=4), 20 (n=2), 22 (n=3), 24 (n=2), 27 (n=1); №2: 30 (n=1), 34 (n=1), 35 (n=2), 37 (n=2), 38 (n=1), 39 (n=1); №3: 40 (n=2), 45 (n=2), 48 (n=2); №4: 51 (n=3), 54 (n=1), 57 (n=1), 59 (n=1); №5: черный столбец соответствует одному образцу с визуализируемой патологией, возраст 58 лет; №6: 60 (n=1), 61 (n=1), 65 (n=1), 67 (n=2); №7: черный столбец соответствует одному образцу с визуализируемой патологией, возраст 70 лет; №8: 70 (n=2), 78 (n=3). В: Зависимость $A2E_{ox,deg}$/(A2E+изо-A2E) от возраста донора. Соотношение было рассчитано из данных диаграммы (Б) для образцов без патологии

Спектры флуоресценции и состав флуорофоров липофусциновых гранул ретинального пигментного эпителия кадаверных глаз в двух случаях визуализируемой абиотрофии

При посмертном осмотре глазных бокалов кадаверных глаз в 2 случаях в РПЭ были обнаружены признаки ВМД. Для сравнения с нормой относительного содер-

Таблица 5

Зависимость относительного содержания флуорофоров/групп флуорофоров липофусциновых гранул в хлороформных экстрактах, полученных из ретинального пигментного эпителия индивидуальных кадаверных глаз без видимой патологии и с визуально наблюдаемыми дегенеративными изменениями*

№ пика на рис. 10А	№ группы на рис. 10Б							
	1 (17-29) лет	2 (30-39) лет	3 (40-49) лет	4 (50-59) лет	5 58 лет	6 (60-69) лет	7 70 лет	8 (70-79) лет
1	10,6±0,4	12,5± ,6	13,2± ,2	14,3±0,3	6,9	14,7±0,1	4,0	15,7±0,8
2-4	13,8±0,3	16,4±0,5	16,9±0,3	17,8±0,3	19,9	18,4±0,1	20, 7	19,2±0,7
5	2,9±0,3	4,2±0,3	4,9±0,2	5,3±0,1	5,9	5,3±0,1	6,2	5,3±0,1
6	20,8±0,5	22,0±0,6	23,5±0,7	25,2±0,5	26,9	25,9±0,2	27,2	26,3±0,4
7	2,7±0,3	1,4±0,4	1,0±0,1	0,9±0,1	0,8	0,6±0,2	0,5	0,3±0,1
8	19,0±1,0	13,9±1,4	10,7±1,4	6,1±0,5	7,1	5,1±0,2	7,0	4,1±0,2
9	1,5±0,1	1,9±0,2	2,3±0,3	3,1±0,1	3,1	3,2±0,2	3,3	3,2±0,2
10	4,4±0,3	2,5±0,5	1,8±0,2	1,0±0,3	2,2	0,3±0,1	2,3	0,1±0,1
11	24,3±0,4	25,2±0,4	25,7±0,7	26,3±0,2	27,3	26,6±0,3	28,8	27,4±0,1

*Данные взяты из диаграммы на рис. 10Б.

Таблица 6

Соотношение $A2E_{ox,deg}$/(A2E + iso-A2E) в зависимости от возраста донора *

№ пиков на рис. 10А	№ группы на рис.10Б					
	1 17-29 лет	2 30-39 лет	3 40-49 лет	4 50-59 лет	6 60-69 лет	8 70-79 лет
(1-5) A2Eox,deg (%)	27,32 ± 0,74	32,99 ± 1,31	35,01 ± 0,51	37,39 ± 0,31	38,41 ± 0,08	40,18 ± 0,81
(6,8) A2E + iso-A2E (%)	39,79 ± 0,78	36,01 ± 0,85	34,17 ± 0,79	31,29 ± 0,31	30,99 ± 0,17	30,44 ± 0,55
A2Eox,deg/ A2E+ iso-A2E	0,69 ± 0,03	0,92 ± 0,06	1,02 ± 0,04	1,19 ± 0,02	1,24 ± 0,01	1,32 ± 0,04

*Соотношение было рассчитано из данных табл. 5 для образцов, полученных из кадаверных глаз без признаков патологии ретинального пигментного эпителия.

жания флуорофоров ЛГ из РПЭ данных образцов нами были отобраны кадаверные глаза без признаков патологии от доноров, близких по возрасту к донорами кадаверных глаз с признаками ВМД. РПЭ кадаверного глаза без патологии (норма) является равномерным, без очаговой патологии, в макулярной (фовеолярной) зоне имеется характерная более насыщенная (интенсивная) пигментация клеток. РПЭ глазного дна с признаками ВМД (патология) является неравномерным, разряженным, наблюдается картина «паркетного» глазного дна, в макулярной и парамакулярной зоне можно видеть перераспределение пигмента, множественные друзоподобные отложения в виде желтоватых слегка проминирующих образований

с неровными границами, окруженные зоной гиперпигментации, без тенденций к слиянию.

Из отобранных кадаверных глаз были получены суспензии клеток РПЭ и зарегистрированы их спектры флуоресценции (рис. 11А). Сравнительный флуоресцентный анализ показал, что при наличии патологии в РПЭ максимумы спектров флуоресценции суспензии клеток РПЭ сдвинуты в коротковолновую область по сравнению с образцами, полученными из кадаверных глаз без патологии. Это может указывать на повышенное содержание продуктов фотоокисления и фотодеградации A2E в ЛГ. Более ощутимой является разница в положении максимума для пары а–б (564–528 нм, соответственно). Для второй пары в–г эта разница составила 563–540 нм, соответственно.

Из суспензии клеток РПЭ анализируемых образцов были получены хлороформные экстракты и методом ВЭЖХ проанализирован состав флуорофоров и их относительное содержание в этих хлороформных экстрактах (рис. 11Б; см. табл. 5).

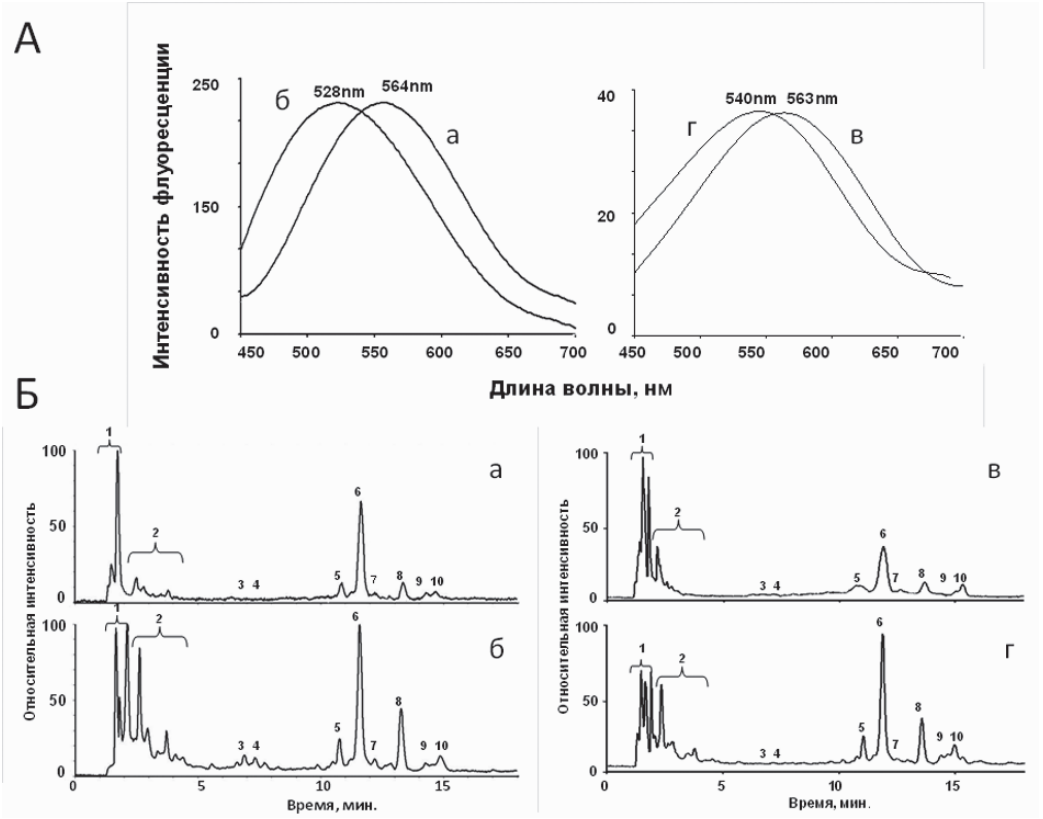


Рис. 11. (А) Спектры флуоресценции суспензии клеток РПЭ из отдельных кадаверных глаз при возбуждении флуоресценции длиной волны 430 нм: а – норма (донор, 59 лет), б – патология (донор, 58 лет), в – норма (донор, 65 лет), г – патология (донор, 70 лет). Нормализованные. (Б) ВЭЖХ-анализ хлороформного экстракта из РПЭ индивидуальных кадаверных глаз: а – норма (донор, 59 лет), б – патология (донор, 58 лет), в – норма (донор, 65 лет), г – патология (донор, 70 лет). Детекция по поглощению на длине волны 430 нм. 1–5 – $A2E_{ox,deg}$; 6 и 8 – A2E и iso-A2E, соответственно; пики 7, 9, 10 не определены (Арбуханова и др., 2012)

Сравнительный ВЭЖХ-анализ хлороформных экстрактов показал различие в относительном содержании флуорофоров ЛГ в РПЭ кадаверного глаза в норме и при патологии. В образцах, полученных из кадаверных глаз с визуально наблюдаемыми признаками ВМД, набор пиков для фракции 1, как можно видеть, более разнообразный, хотя их относительное содержание практически в 2 раза меньше (см. рис. 11Б, табл. 5). Наблюдается также увеличение относительного содержания флуорофоров из фракции 2 и увеличение относительного содержания A2E (пик 6).

Таким образом, с одной стороны, показано увеличение с возрастом доноров относительного содержания как самого A2E, так и $A2E_{ox,deg}$ в хлороформных экстрактах, полученных из РПЭ индивидуальных кадаверных глаз без видимых патологий. С другой стороны, при наличии визуально наблюдаемых патологий в РПЭ видно изменение относительного состава флуорофоров хлороформного экстракта из РПЭ, а именно: уменьшение относительного содержания продуктов 1-й группы пиков, увеличение относительного содержания продуктов 2-й группы пиков (1-я и 2-я группы пиков, как мы предполагаем, могут быть продуктами фотоокисления и фотодеградации A2E–$A2E_{ox,deg}$) и увеличение содержания A2E. При этом меняется (смещается в коротковолновую область максимум спектра) и суммарный спектр флуоресценции суспензии клеток РПЭ.

Таким образом, сравнительный ВЭЖХ-анализ показал, что изучение качественного и количественного состава флуорофоров ЛГ в норме и при патологии становится актуальным и может являться предметом дальнейших исследований. Не исключено, что при некоторых патологиях содержание A2E и продуктов его фотоокисления и фотодеградации может существенно отличаться от нормы.

6. Заключение

Одним из путей развития и совершенствования нового неинвазивного метода диагностики глазных патологий – метода аутофлуоресценции глазного дна – является изучение состава флуорофоров ЛГ, формирующих картину аутофлуоресценции, и выяснения их вклада в общую интенсивность флуоресценции в норме и при патологии. На сегодняшний день остается невыясненным вопрос о механизме возникновения гипераутофлуоресценции, и какие флуорофоры ЛГ отвечают за этот феномен (Sparrow et al., 2010). Существует несколько предположений, которые могут объяснить этот феномен. В первую очередь – это повышенный уровень неспецифического синтеза бисретиноидов в фоторецепторной клетке за счет нарушения механизмов зрительного цикла, отвечающих за удаление отработанного ПТР из фоторецепторной мембраны. Эти нарушения влекут за собой повышенное содержание ЛГ в клетках РПЭ, которые и могут быть источником гипераутофлуоресценции. Например, такого рода явление наблюдается при болезни Штаргардта, когда белок-переносчик (ABCR) является дефектным (Travis, 1998; Островский, 2005; Rozanowska, Sarna, 2005). Тем не менее, повышенный уровень ЛГ в клетках РПЭ не рассматривается как основной источник гипераутофлуоресценции. Предполагается, что таковым могут быть продукты фотоокисления и фотодеградации A2E

и других бисретиноидов. Показано, что интенсивность флуоресценции некоторых продуктов фотоокисления A2E повышается в 6–13 раз по сравнению с самим A2E (Sparrow et al., 2010; Kim et al., 2010). Источником гипераутофлуоресценции при некоторых патологиях могут стать и сами фоторецепторные клетки. При дегенеративных процессах в РПЭ нарушается фагоцитарная функция его клеток, и это приводит к тому, что фоторецепторные клетки становятся аномальными с повышенным содержанием бисретиноидов (Schmitz-Valckenberg et al., 2004; Smith et al., 2009; Secondi et al., 2012).

В данной работе представлены результаты экспериментальных исследований спектральных свойств побочных продуктов фотолиза родопсина – ПТР и его производных в фоторецепторных клетках и клетках РПЭ в норме и при патологии. Для исследования спектральных свойств производных ПТР в фоторецепторной мембране была использована модельная система, имитирующая ситуацию избыточного накопления в фоторецепторных мембранах как свободного ПТР, так и связанного с аминогруппами белка и окружающих его фосфолипидов. Нами показано, что продукты взаимодействия ПТР с аминогруппами белковых молекул и фосфатидилэтаноламина, входящего в состав фоторецепторных мембран, являются сильными флуорофорами. Кроме того, полученные данные позволяют предполагать, что в ситуации *in vivo* избыточное накопление ПТР и его производных в фоторецепторной мембране может приводить к перекисному окислению липидов и повреждению белковых молекул, в частности родопсина, в фоторецепторных клетках. Другими словами, избыточное накопление ПТР и его производных в фоторецепторной мембране можно рассматривать как фактор риска, объясняющий усугубляющее действие света при развитии дегенеративных заболеваний сетчатки. В связи с этим детальное исследование флуоресцентных свойств побочных продуктов фотолиза родопсина в последнее время становится актуальным в связи с попытками модифицировать и усовершенствовать новый неинвазивный метод диагностики в офтальмологии. Так, например, такой конъюгат ПТР, как A2PE, может быть обнаружен только в фоторецепторных клетках. При попадании этого продукта в РПЭ в результате фагоцитоза обломков фоторецепторов из него в результате ферментативного гидролиза образуется A2E (Parish et al., 1998; Ben-Shabat et al., 2002). Таким образом, A2PE может быть маркером аутофлуоресценции фоторецепторных клеток (Sparrow et al., 2010).

На модельной системе хлороформного экстракта ЛГ из клеток РПЭ, содержащего липофильные соединения, изучены спектральные характеристики флуорофоров, формирующих in vivo картину аутофлуоресценции глазного дна. Проведен компонентный анализ флуорофоров в хлороформном экстракте ЛГ. Хроматографический (метод ВЭЖХ) и последующий спектральный анализ хлороформного экстракта показал, что этот экстракт содержит более 20 флуорофоров. Спектральный диапазон флуоресценции этих флуорофоров представляет собой область от 380 нм до 540–630 нм. Из этих флуорофоров доминирующими продуктами по поглощению в видимой области спектра (400–500 нм) являются A2E, iso-A2E и другие изомерные формы A2E. Однако интенсивность флуоресценции этих продуктов в хлороформном экстракте значительно меньше по сравнению с продуктами фото-

окисления и фотодеградации A2E. Проведенный нами подробный анализ флуорофоров в хлороформном экстракте из клеток РПЭ указывает на то, что в суммарную картину аутофлуоресценции глазного дна при стандартной в существующих офтальмоскопах длине волны возбуждения 488 нм могут вносить определенный вклад не только A2E, но и продукты его фотоокисления и фотодеградации, а также и другие бис-ретиноиды. Химическая природа этих продуктов и динамика их накопления при развитии дегенеративного заболевания сетчатки или при ее старении является предметом дальнейших исследований.

Литература

Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Билиньска Б., Кржижановский Л., Фельдман Т.Б., Островский М.А. Сравнение фотосенсибилизирующего действия липофусциновых гранул из пигментного эпителия глаза человека и их флуорофора A2E // Докл. РАН. 2005. Т. 405. № 6. С. 458-460.

Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Островский М.А. Исследование механизмов фототоксического действия бис-ретинилиденэтаноламина (A2E) на фоторецепторные мембраны. // Сенсорные системы. 2006. Т. 20. № 4. С. 265-269.

Донцов А.Е., Сакина Н.Л., Голубков А.М., Островский М.А. Светоиндуцированное высвобождение из липофусциновых гранул ретинального пигментного эпителия глаза человека токсичных продуктов фотоокисления флуорофора A2E // Докл. РАН. 2009. Т. 425. № 5.С. 683-687.

Кацнельсон Л.А., Форофонова Т.И., Бунин А.Я. Сосудистые заболевания глаза. М.: Медицина, 1990. 272 с.

Либман Е.С., Шахова Е.В. Состояние и динамика слепоты и инвалидности вследствие патологии органа зрения в России // Матер. VII съезда офтальмологов России. 2000. С. 209-214.

Логинова М.Ю., Ростовцева Е.В., Фельдман Т.Б., Островский М.А. Фотоповреждающее действие полностью-транс-ретиналя и продуктов его превращения на молекулу родопсина в составе фоторецепторной мембраны // Биохимия. 2008а. Т. 73. Вып. 2. С. 162-172.

Логинова М.Ю., Е.В. Ростовцева, Фельдман Т.Б., Островский М.А. Нарушение способности A2-родопсина к регенерации после облучения его видимым (синим) светом. // Докл. РАН. 2008б. Т. 419. № 6. С. 838-841.

Логинова М.Ю., Загидуллин В.Э., Фельдман Т.Б. и др. Спектральные характеристики флуорофоров – продуктов взаимодействия полностью-транс-ретиналя с родопсином и липидами в фоторецепторной мембране наружного сегмента палочек сетчатки глаза // Биологические мембраны. 2009. Т. 26. № 2. С. 83-93.

Островский М.А. Молекулярные механизмы повреждающего действия света на структуры глаза и системы защиты от такого повреждения // Успехи биологической химии. 2005. Т. 45. С. 173-204.

Островский М.А., Федорович И.Б. Фотосенсибилизированное окисление как механизм повреждающего действия света на сетчатку глаза // Химическая физика. 1996. Т. 15. С. 73-80.

Петрухин А.Н., Астафьев А.А., Золотавин П.Н. и др. Гетерогенность структуры и флуоресценция одиночной липофусциновой гранулы из ретинального пигментного эпителия глаза человека: исследование методами атомно-силовой микроскопии и микроскопии ближнего поля // Докл. РАН. 2005. Т. 405. № 6. С. 445-449.

Соколов В.С., Соколенко Е.А., Соколов А.В. и др. Взаимодействие бис-ретинилиден этаноламина (A2E) с бислойными липидными мембранами в темноте и при действии света // Биологические мембраны. 2005. Т. 22. С. 361-369.

Фельдман Т.Б., М.А. Яковлева, Донцов А.Е., Островский М.А. Спектры флуоресценции и возбуждения флуорофоров липофусциновых гранул, полученных из ретинального пигментного эпителия кадаверных глаз человека // Известия РАН. Серия химическая. 2010. № 1. С. 269-276.

Шамшинова А.М. Наследственные заболевания сетчатки и зрительного нерва. М.: Медицина, 2001. 528 с.

Яковлева М.А., Сакина Н.Л., Кононихин А.С. и др. Обнаружение и исследование продуктов фотоокисления N-ретинилиден-N-ретинилэтаноламин (A2E) – флуорофора липофусциновых гранул из клеток пигментного эпителия глаза человека. // Докл. РАН. 2006. Т. 409. № 3. С. 411-414.

Яковлева М.А., Фельдман Т.Б., Полонская З.М. и др. Вызванные видимым светом изменения спектров флуоресценции флуорофоров липофусциновых гранул, полученных из ретинального пигментного эпителия кадаверных глаз человека. // Офтальмохирургия. 2009. № 5. С. 59-64.

Яковлева М.А., Фельдман Т.Б., Крупенникова А.С., Борзенок С.А., Островский М.А. Флуорофоры липофусциновых гранул, ответственные за аутофлуоресценцию глазного дна человека // Известия РАН. Серия химическая. 2010. № 12. С. 2252-2260.

Allikmets R., Singh N., Sun H. et al. A photoreceptor cell-specific ATP-binding transporter gene (ABCR) is mutated in recessive Stargardt macular dystrophy // Nature Genetics. 1997. Vol. 15. P. 236-245.

Ambati J., Ambati B.K., Yoo S.H., Ianchulev S., Adamis A.P. Age-related macular degeneration: etiology, pathogenesis, and therapeutic strategies // Surv. Ophthalmol. 2003. Vol. 48. P. 257-293.

AREDS. The Age-Related Eye Disease Research Group: The Age-Related Eye Disease Study (AREDS): Risk factors associated with age-related macular degeneration. AREDS Report № 3 // Ophthalmology. 2000. Vol. 107. P. 2224-2232.

Avalle L.B., Wang Z., Dillon J.P., Gaillard E.R. Observation of A2E oxidation products in human retinal lipofuscin // Exp. Eye Res. 2004. Vol. 78. № 4. P. 895-898.

Bachilo S.M., Bondarev S.L., Gillbro T. Fluorescence properties of protonated and unprotonated Schiff bases of retinal at room temperature // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1996. Vol. 34. P. 39-46.

Bellmann C., Rubin G.S., Kabanarou S.A., Bird A.C., Fitzke F.W. Fundus autofluorescence imaging compared with different confocal scanning laser ophthalmoscopes // Br. J. Ophthalmol. 2003. Vol. 87. P. 1381–1386.

Ben-Shabat S., Itagaki Y,, Jockusch S., Sparrow J.R., Turro N.J., Nakanishi K. Formation of a nonaoxirane from A2E, a lipofuscin fluorophore related to macular degeneration, and evidence of singlet oxygen involvement // Angew. Chem. Int. Ed. 2002a. Vol. 42. № 5. P. 814-817.

Ben-Shabat S., Parish C.A., Vollmer H.R. et al. Biosynthetic studies of A2E, a major fluorophore of retinal pigment epithelial lipofuscin // J. Biol. Chem. 2002b. Vol. 277. № 9. P. 7183-7190.

Bindewald-Wittich A., Bird A.C., Dandekar S.S. et al. Classification of fundus autofluorescence patterns in early age-related macular disease // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2005. Vol. 46. P. 3309-3314.

Bird A.C., Bressler N.M., Bressler S.B. et al. An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration // Surv. Ophthalmol. 1995. Vol. 39. № 5. P. 367-374.

Boulton M., Docchio F., Dayhaw-Barker P., Ramponi R., Cubeddu R. Age-related changes in the morphology, absorption and fluorescence of melanosomes and lipofuscin granules of the retinal pigment epithelium // Vision Res. 1990. Vol. 30. № 9. P.1291-1303.

Boulton M., Dontsov A., Jarvis-Evans J., Ostrovsky M., Svistunenko D. Lipofuscin is a photoinducible free radical generator // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1993. Vol. 19. P. 201-204.

Boulton M., Rozanowska M., Rozanowski B., Wess T. The photoreactivity of ocular lipofuscin // Photochem. Photobiol. Sci. 2004. Vol. 8. P. 759-764.

Brunk U.T., Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function // Free Radical Biol. Med. 2002. Vol. 33. P. 611-619.

Chang Y., Zeng J., Zhao C. et al. Assessing Susceptibility to Age-Related Macular Degeneration With Genetic Markers and Environmental Factors // Am. J. Ophthalmol. 2011. Vol.129. № 3. P. 344-351.

Delori F.C., Dorey C.K., Staurenghi G. et al. In vivo Fluorescence of the Ocular Fundus Exhibits Retinal Pigment Epithelium Lipofuscin Characteristics // IOVS. 1995. Vol. 36. P. 718-729.

Delori F.C., Staurenghi G., Arend O. et al. In vivo measurement of lipofuscin in Stargardt's disease – Fundus flavimaculatus // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1995. Vol. 36. № 11. P. 2327-2331.

Dillon J.P., Wang Z., Avalle L.B., Gaillard E.R. The photochemical oxidation of A2E results in the formation of a 5,8,5',8',-bis-furanoid oxide // Exp. Eye Res. 2004. Vol. 79. P. 537-542.

Eldred G.E., Katz M.L. Fluorophores of the human retinal pigment epithelium: separation and spectral characterization // Exp. Eye Res. 1988. Vol. 47. P. 71-86.

Fedorovich I.B., Semenova E.M., Grant K., Converse C.A., Ostrovsky M.A. Photosensitized light-induced damage of IRBP (interphotoreceptor retinoid-binding protein): effects on binding properties // Current Eye Research. 2000. Vol. 21. P. 975-980.

Feeney-Burns L., Hilderbrand E.S., Eldridge S. Aging human RPE: Morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1984. Vol. 25. P. 195-200.

Fine S.L., Berger J.W., Maguire M.G., Ho A.C. Age-related macular degeneration // New Engl. J. Med. 2000. Vol. 342. P. 483-492.

Fishkin N.E., Jang Y-P, Itagaki Y., Sparrow J.R, Nakanishi K. A2-Rhodopsin: a new fluorophore isolated from photoreceptor outer segments // Org. Biomol. Chem. 2003. Vol. 1. P. 1101-1105.

Fu P.P., Cheng S.-H., Coop L., Xia Q. et al. Photoreaction, phototoxicity and photocarcinogenisity of retinoids // J. Environ. Sci. Health. Pt. 3. 2003. Vol. C21. № 2. P. 165-197.

Harper W.S., Gaillard E.R. A photochemical study of (E,E,E,E)-2-[9-(2-Hydroxyethyl)imino-3,7-dimethyl-1,3,5,7-decatrien-1-y]-1,3,3-trimethylcyclohexene, a derivative of all-trans-retinal and ethanolamine // Photochem. Photobiol. 2003. Vol. 78. № 3. P. 298-305.

Holz F.G., Bellman C., Staudt S., Schutt F., Volcker H.E. Fundus Autofluorescence and Development of Geographic Atrophy in Age-Related Macular Degeneration // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2001. Vol. 42. № 5. P. 1051-1056.

Holz F.G., Bindewald-Wittich A., Fleckenstein M. et al. Progression of geographic atrophy and impact of fundus autofluorescence patterns in age-related macular degeneration // Am. J. Ophthalmol. 2007. Vol. 143. P. 463-472.

Holz F.G., Schmitz-Valckenberg S., Spaide R.F., Bird A.C. Atlas of Fundus Autofluorescence Imaging . Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2007. 342 p.

Jang Y.P., Matsuda H., Itagaki Y., Nakanishi K., Sparrow J.R. Characterization of peroxy-A2E and furan-A2E photooxidation products and detection in human and mouse retinal pigment epithelial cell lipofuscin // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280. № 48. P. 39732-39739.

Jockusch S., Ren R.X., Jang Y.P. et al. Photochemistry of A1E, a retinoid with a conjugated pyridinium moiety: competition between pericyclic photooxygenation and pericyclization // J. Am. Chem. Soc. 2004. Vol. 126. P. 4646-4652.

Kim S.R., Nakanishi K., Itagaki Y., Sparrow J. Photooxidation of A2-PE, a photoreceptor outer segment fluorophore, and protection by lutein and zeaxanthin // Exp. Eye Res. 2006. Vol. 82. P. 828-839.

Kim S.R., Jang Y.P., Jockusch S. et al. The all-trans-retinal dimer series of lipofuscin pigments in retinal pigment epithelial cells in a recessive Stargardt disease model // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. Vol. 104. № 49. P. 19273-19278.

Kim S.R., Jang Y., Sparrow J.R. Photooxidation of RPE lipofuscin bisretinoids enhances fluorescence intensity // Vision Res. 2010. Vol. 50. P. 729-736.

Klein R., Klein B.E.K., Jensen S.C., Meuer S.M. The five – year incidence and progression of age – related maculopathy. The Beaver Dam Eye Study // Ophthalmol. 1997. Vol. 104. № 11. P. 1804-1812.

Klein R., Klein B.E.K., Lee K.E., Cruickshanks K.J., Chappell R.J. Changes in visual acuity in a population over a 10–year period. The Beaver Dam Study // Ophthalmology. 2001. Vol. 108. P. 1757-1766.

Klein R., Peto T., Bird A., Vannewkirk M.R. The epidemiology of age-related macular degeneration // Am. J. Ophthalmol. 2004. Vol. 137. P. 486-495.

Lamb L.E., Simon J.D. A2E: A component of ocular lipofuscin // Photochem. Photobiol. 2004. Vol. 79. P. 127–136.

Liu R.S.H., Hammand G.S. Photochemical reactivity of polyenes: from dienes to rhodopsin, from microseconds to femtoseconds // Photochem. Photobiol. Sci. 2003. Vol. 2. P. 835-844.

Liu J., Itagaki Y., Ben-Shabat S., Nakanishi K., Sparrow J.R. The biosynthesis of A2E, a fluorophore of aging retina, involves the formation of the precursor, A2-PE, in the photoreceptor outer segment membrane // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 29354-29360.

Maeda T., Golczak M., Maeda A. Retinal Photodamage Mediated by All-trans-retinal // Photochem. Photobiol. 2012. Vol. 88. P. 1309-1319.

Masutomi K., Chen C., Nakatani K., Koutalos Y. All-Trans Retinal Mediates Light-Induced Oxidation in Single Living Rod Photoreceptors // Photochem. Photobiol. 2012. Vol. 88. P. 1356-1361.

Molday R.S., Zhong M. Quazi F. The Role of the Photoreceptor ABC Transporter ABCA4 in Lipid Transport and Stargardt Macular Degeneration // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1791. P. 573-583.

Nguyen-Legros J., Hicks D. Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium // Int. Rev. Cytol. 2000. Vol. 196. P. 245-313.

Palczewski K., Jager S., Buczylko J. et al. Rod Outer Segment Retinol Dehydrogenase: Substrate Specificity and role in phototransduction // Biochemistry. 1994. Vol. 33. P. 13741-13750.

Parish C.A., Hashimoto M., Nakanishi K., Dillon J., Sparrow J. Isolation and one-step preparation of A2E and iso-A2E, fluorophores from human retinal pigment epithelium // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. Vol. 95. № 25. P. 14609-14613.

Radu R.A., Mata N.L., Bagla A., Travis G.H. Light exposure stimulates formation of A2E oxiranes in a mouse model of Stargardt's macular degeneration // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004. Vol. 101. № 16. P. 5928-5933.

Robson A.G., Michaelides M., Saihan Z. et al. Functional characteristics of patients with retinal dystrophy that manifest abnormal parafoveal annuli of high density fundus autofluorescence: a review and update // Doc. Ophthalmol. 2008. Vol. 116. P. 79-89.

Rozanowska. M., Sarna T. Light-induced damage to the retina: role of rhodopsin chromophore revisited // Photochem. Photobiol. 2005. Vol. 81. P. 1305-1330.

Saari J.C. Biochemistry of visual pigment regeneration: the Friedenwald lecture // IOVS. 2000. Vol. 41. P. 337-348.

Schmitz-Valckenberg S., Jorzik J., Unnebrink K., Holz F.G.; FAM Study Group. Analysis of digital scanning laser ophthalmoscopy fundus autofluorescence images of geographic atrophy in advanced age-related macular degeneration // Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. 2002. Vol. 240. P. 73-78.

Schmitz-Valckenberg S., Bultmann S., Dreyhaupt J. et al. Fundus autofluorescence and fundus perimetry in the junctional zone of geographic atrophy in patients with age-related macular degeneration // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2004. Vol. 45. P. 4470-4476.

Schraermeyer U., Heimann K. Current understanding on the role of retinal pigment epithelium and its pigmentation // Pigment Cell Res. 1999. Vol. 12. № 4. P. 219-236.

Secondi R., Kong J., Blonska A.M., Staurenghi G., Sparrow J.R. Fundus autofluorescence findings in a mouse model of retinal detachment // IOVS. 2012. Vol. 53. P. 5190-5197.

Smith A.F. The growing importance of pharmacoeconomics: the case of age-related macular degeneration // Br. J. Ophthalmol. 2010. Vol. 94. P. 1116-1117.

Smith R.T., Koniarek J.P., Chan J. et al. Autofluorescence characteristics of normal foveas and reconstruction of foveal autofluorescence from limited data subsets // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2005. Vol. 46. № 8. P. 2940-2946.

Smith R.T., Gomes N.L., Barile G. et al. Lipofuscin and autofluorescence metrics in progressive STGD // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2009. Vol. 50. P. 3907-3914.

Spaide R.F. Fundus autofluorescence and age-related macular degeneration // Ophthalmology. 2003. Vol. 110. P. 392-399.

Sparrow J.R., Vollmer-Snarr H.R., Zhou J. et al. A2E-epoxides damage DNA in retinal pigment epithelial cells. Vitamin E and other antioxidants inhibit A2E-epoxide formation // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. № 20. P. 18207-18213.

Sparrow J.R., Wu Y., Kim C.Y., Zhou J. Phospholipid meets all-trans-retinal: the making of RPE bisretinoids // J. Lipid. Res. 2009. Vol. 51. P. 247-261.

Sparrow J.R., Wu Y., Nagasaki T., Yoon K.D., Yamamoto K., Zhou J. Fundus autofluorescence and the bisretinoids of retina // Photochem. Photobiol. Sci. 2010. Vol. 9. P. 1480-1489.

Sparrow J.R., Gregory-Roberts E., Yamamoto K. et al. The bisretinoids of retinal pigment epithelium // Prog. Retin. Eye Res. 2012. Vol. 31. P. 121-135.

Sun H., Nathans J. ABCR, the ATP-binding cassette transporter responsible for Stargardt macular dystrophy, is an efficient target of all-trans-retinal-mediated photooxidative damage in vitro. Implications for retinal disease // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276. P. 11766-11774.

Suter M., Reme C., Grimm C., Wenzel A. et al. Age-related macular degeneration: the lipofuscin component A2E detaches pro-apoptotic proteins from mitochondria and induces apoptosis in mammalian retinal pigment epithelial cells // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. № 50. P. 39625-39630.

Takeuchi S., Tahara T. Ultrafast fluorescence study on the excited singlet-state dynamics of all-trans-retinal // J. Phys. Chem. 1997. Vol. 101. P. 3052-3060.

Tahara T., Hamaguchi H. Picosecond time-resolved fluorescence study of all-trans retinal: the existence of two fluorescent singlet excited states // Chem. Phys. Lett. 1995. Vol. 234. P. 275-280.

Travis G.H. Mechanisms of cell death in the inherited retinal degenerations // Am. J. Hum. Genet. 1998. Vol. 62. P. 503-508.

Von Ruckmann A., Fitzke F.W., Bird A.C. Distribution of fundus autofluorescence with a scanning laser ophthalmoscope // Br. J. Ophthalmol. 1995. Vol. 79. P. 407-412.

Wang J.J., Klein R., Smith W., Klein B., Tomany S., Mitchell P. Cataract surgery and the 5-year incidence of late-stage age-related maculopathy: pooled findings from the Beaver Dam and Blue Mountains eye studies // Ophthalmol. 2003. Vol. 110. P. 1960-1967.

Wang Z., Keller L.M.M., Dillon J., Gaillard E.R. Oxidation of A2E Results in the Formation of Highly Reactive Aldehydes and Ketones // Photochem. Photobiol. 2006. Vol. 82. P. 1251-1257.

Weng J., Mata N.L., Azarian S.M., Tzekov R.T., Birch D.G., Travis G.H. Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice // Cell. 1999. Vol. 98. P. 13-23.

White A. Effect of pH on fluorescence of tyrosine, tryptophan and related compounds // Biochem. J. 1959. Vol. 71. P. 217-220.

Wielgus A.R., Collier R.J., Martin E. et al. Blue light induced A2E oxidation in rat eyes – experimental animal model of dry AMD // Photochem. Photobiol. Sci. 2010. Vol. 9. P. 1505-1512.

Williams R.A., Brady B.L., Thomas R.J. The psychosocial impact of macular degeneration // Arch. Ophthalmol. 1998. Vol. 116. № 4. P. 514-520.

Wu Y., Fishkin N.E., Pande A., Pande J., Sparrow J.R. Novel lipofuscin bisretinoids prominent in human retina and in a model of recessive Stargardt disease // J. Biol. Chem. 2009. Vol. 284. № 30. P. 20155-20166.

Wu Y., Yanase E., Feng X., Siegel M.M., Sparrow J.R. Structural characterization of bisretinoid A2E photocleavage products and implications for age-related macular degeneration // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2010. Vol. 107. № 16. P. 7275-7280.

Yamamoto K., Yoon K.D., Ueda K., Hashimoto M., Sparro J.R. A novel bisretinoid of retina is an adduct on glycerophosphoetanolamin // IOVS. 2011. Vol. 52. № 12. P. 9084-9090.

Yoon K.D., Yamamoto K., Ueda K., Zhou J., Sparrow J.R. A novel source of methylglyoxal and glyoxal in retina: Implications for age-related macular degeneration // PLoS One. 2012. Vol. 7. Issue 7. P. e41309.

Повреждение и восстановление сетчатки у мышей после воздействия генотоксических агентов ионизирующей радиации и метилнитрозомочевины

В.А. Тронов, Ю.В. Виноградова, В.А. Поплинская, М.А. Островский

Содержание

1. Введение
2. Ответ сетчатки глаза мышей на облучение
3. Ответ сетчатки глаза на введение метилнитрозомочевины
4. Адаптивный ответ сетчатки глаза на введение метилнитрозомочевины и облучение ускоренными протонами
5. Высокая генотоксическая устойчивость сетчатки глаза
6. Функциональное и структурное восстановление сетчатки глаза после генотоксического воздействия

1. Введение

Пострадиационная ретинопатия и когнитивные расстройства часто бывают нежелательными побочными эффектами радиотерапии. Так, при радиотерапии опухолей носоглотки и глаза суммарная доза облучения превышает 50 Гр. При протонной радиотерапии меланомы глаза кумулятивная доза фракционированного облучения составляет 54–75 Гр. Понимание механизмов патогенеза дегенеративных заболеваний сетчатки глаза является ключевой и нерешенной проблемой современной экспериментальной и клинической офтальмологии.

Изучение механизмов действия различных видов ионизирующего излучения на сетчатку глаза принципиально важно как для оценки рисков постлучевых осложнений, возникающих при лучевой терапии глаза и мозга, так и вполне реальной опасности, возникающей в ходе длительных космических полетов. В последнем случае речь идет об опасности повреждающего действия тяжелых заряженных частиц галактического происхождения вне магнитосферы Земли. При этом клинически значимый повреждающий эффект радиации на сетчатку глаза может возникнуть не сразу, а спустя месяцы и даже годы.

Цитотоксическая химиотерапия также вызывает офтальмологические осложнения в виде обратимых и необратимых острых и хронических глазных заболеваний. В середине 90-х годов в литературе появились сообщения о цитотоксическом действии супермутагена метилнитрозомочевины (МНМ) на сетчатку глаза у лабораторных животных. МНМ – монофункциональный метилирующий агент, вызывающий повреждение ДНК; МНМ и ее производные являются базовым компонентом стандартных протоколов химиотерапии меланомы. Особенностью действия МНМ на

Сокращения: ГМК – глиальные Мюллеровские клетки; МНМ – метилнитрозомочевины; ЭРГ – электроретинограмма; Topo 2 – топоизомераза 2.

сетчатку глаза является ее высокая избирательная цитотоксичность по отношению только к фоторецепторам.

Наследственная или вызванная внешним воздействием дегенерация сетчатки глаза начинается с гибели фоторецепторов, вслед за которой разрушается система трофической поддержки ткани, приводящая к гибели нейронов сетчатки (Marc et al., 2003). Хотя доминирующей формой гибели фоторецепторов сетчатки признается апоптоз (Xu, 1996; Marigo, 2007), тем не менее связь повреждения ДНК и ее репарации с гибелью постмитотических клеток, формирующих сетчатку, на сегодняшний день не исследована. Целью данной работы было исследование связи повреждения и репарации ДНК с дегенеративными изменениями в сетчатке глаза после воздействия на мышей ионизирующей радиации (γ-квантов, ускоренных протонов) и генотоксического агента метилнитрозомочевины (МНМ). Гамма-излучение вызывает, главным образом, однонитевые разрывы ДНК, равномерно распределенные по всему геному. Ускоренные протоны более эффективны в индукции двунитевых разрывов, локализующихся в области трека частицы (Moertel et al., 2004). Двунитевые разрывы являются летальным повреждением из-за их высокой эффективности в индукции апоптоза в делящихся клетках (Lips, Kaina, 2001). Метилирующий агент метилнитрозомочевина вызывает в ДНК безразрывные дефекты – метилированные основания, апуриновые и апиримидиновые (АП) сайты (Beranek, 1990). Показано, что МНМ вызывает апоптоз фоторецепторов сетчатки после однократного в/б введения животным в дозе >60 мг/кг (Tsubura et al., 2010). Таким образом, три используемых агента охватывают основные типы повреждений ДНК и механизмы их репарации.

2. Ответ сетчатки глаза мышей на облучение

Гамма-облучение и облучение протонами в дозе 14 Гр не вызывают дегенерации сетчатки в течение 7 дней, что прослеживается на микроскопических срезах сетчатки (рис. 1а–д) и подтверждается результатами морфометрии (рис. 1е,ж). Небольшое понижение толщины ядерного слоя фоторецепторов спустя 7 дней после облучения протонами не сопровождалось морфологическими изменениями ядер и сегментов фоторецепторов (см. рис. 1д).

Для интактных и облученных в дозе 14 Гр животных определяли зависимость амплитуды электроретинограммы от интенсивности возбуждающей вспышки белого света с интервалом между ними 3 мин (рис. 2Б). Как видно, и для контрольных, и для облученных животных зависимость выходит на плато в области интенсивностей от -1,5 до -0,5 лог. ед. Это делает правомочным усреднение амплитуды ЭРГ в этом диапазоне интенсивностей. Найденные таким образом средние значения амплитуды ЭРГ отражены в гистограмме (рис. 2В). Из гистограммы следует, что достоверные отличия между контрольными и облученными животными отсутствуют (см. рис. 2В).

Тем не менее, несмотря на отсутствие изменений в морфологии и функциональной активности сетчатки в облученных мышах, γ- и протонное облучение

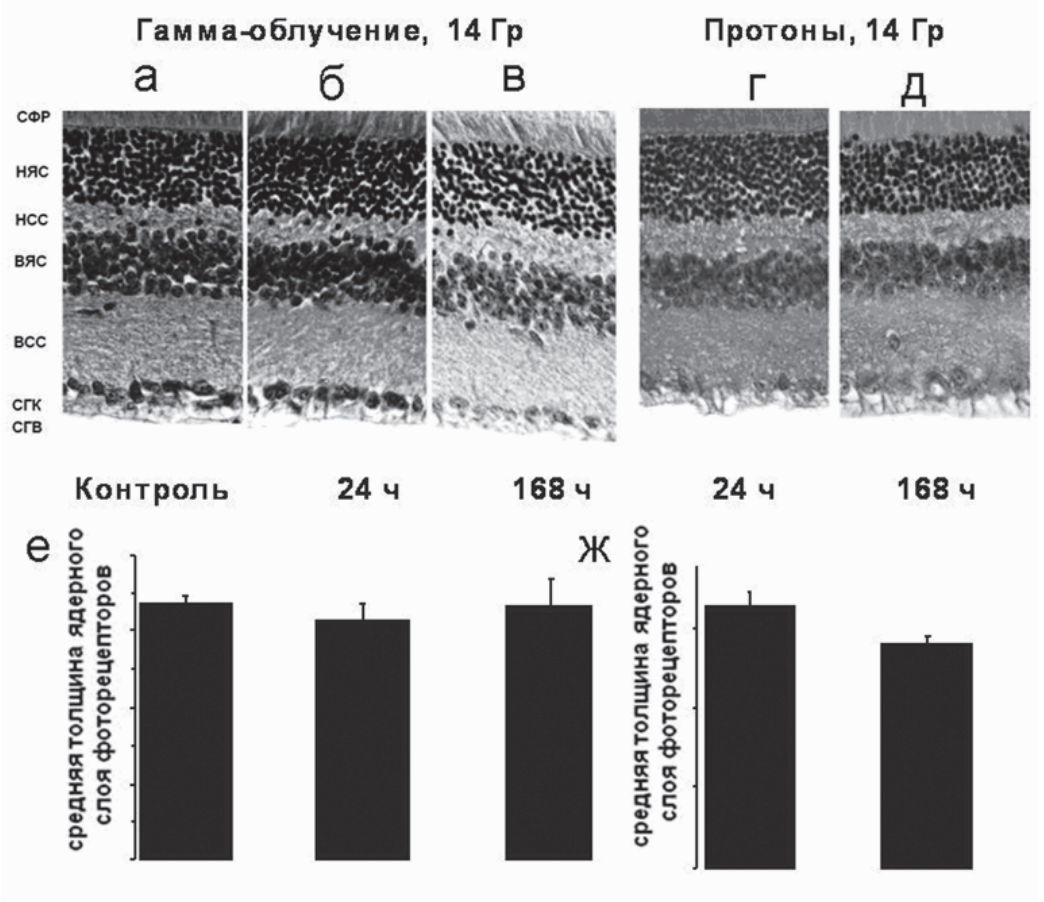


Рис. 1. Микрофотографии сетчатки глаза мышей (а-д), облученных γ-квантами и ускоренными протонами (14 Гр), спустя разное время после воздействия и соответствующая им толщина ядерного слоя фоторецепторов (е, ж)

14 Гр вызывало увеличение экспрессии генострессовых белков P53 и ATM (рис. 3А,Б, соответственно). Отметим также, что для обоих видов облучения наблюдалась нормализация уровней экспрессии 12–14 ч после воздействия.

Поскольку p53 и ATM являются сенсорами одно- и двунитевых разрывов в ДНК (ОР и ДР), была исследована динамика накопления и репарации таких разрывов в сетчатке. Как видно из рис. 4, возникающие в ответ на облучение ОР и ДР в ДНК эффективно удаляются в течение 10–12 ч после воздействия γ-излучения и протонами, что коррелирует с динамикой угасания экспрессии белков P53 и ATM (см. рис. 4).

Локализация облучения протонами только на голову позволила увеличить дозу облучения до 25 Гр, после которой мыши сохраняли жизнеспособность в течение 6 дней. В результате удалось наблюдать нарастающую во времени дегенерацию фоторецепторного слоя сетчатки в виде разупорядочения и деструкции сегментов и снижения плотности упаковки ядерного слоя (рис. 5) и его толщины (рис. 6).

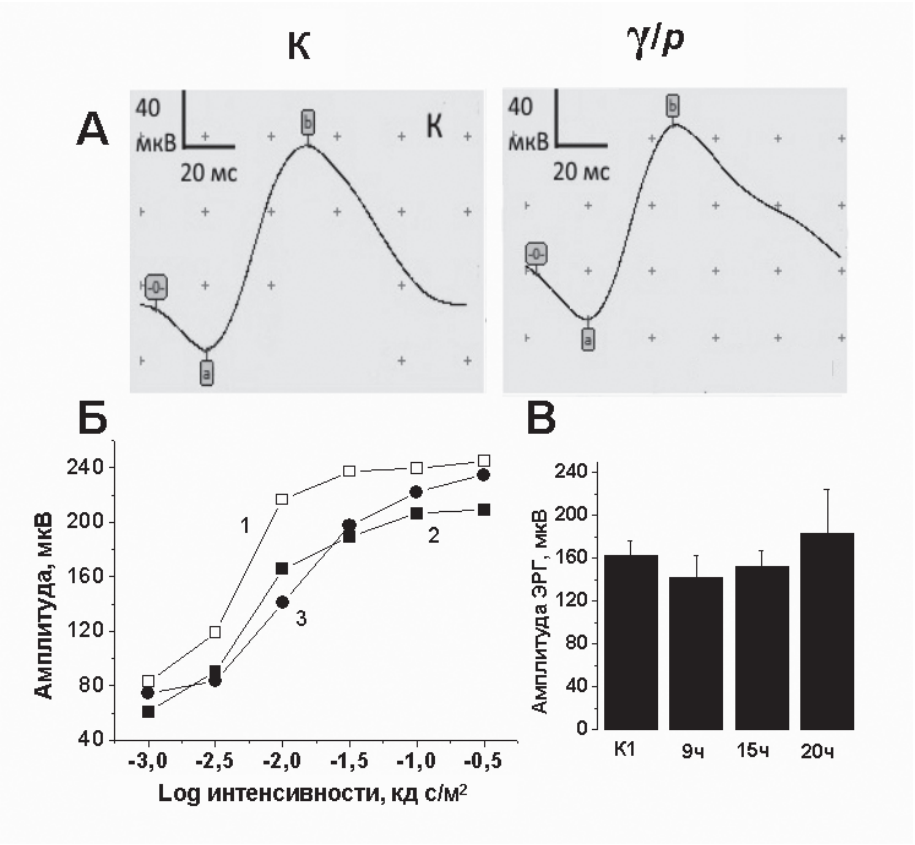


Рис. 2. Влияние тотального облучения мышей γ-квантами (γ) и ускоренными протонами (р) в дозе 14 Гр на показатели физиологической активности (ЭРГ) сетчатки у мышей

А – профили ЭРГ; Б — зависимости амплитуды ЭРГ от интенсивности вспышек белого света у интактных (1) и облученных животных (2, 3); В — гистограмма амплитуды ЭРГ у интактных мышей (К1) и облученных через разное время (9 ч, 15 ч, 20 ч) после воздействия

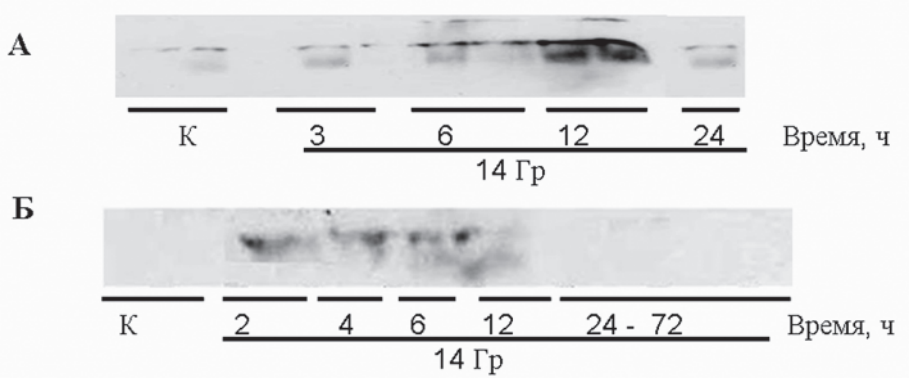


Рис. 3. Вестер-анализ экспрессии белков p53 (А) и ATM (Б) в сетчатке глаза у мышей, облученных γ-квантами (А) и ускоренными протонами (Б) в дозе 14 Гр, через разное время после облучения

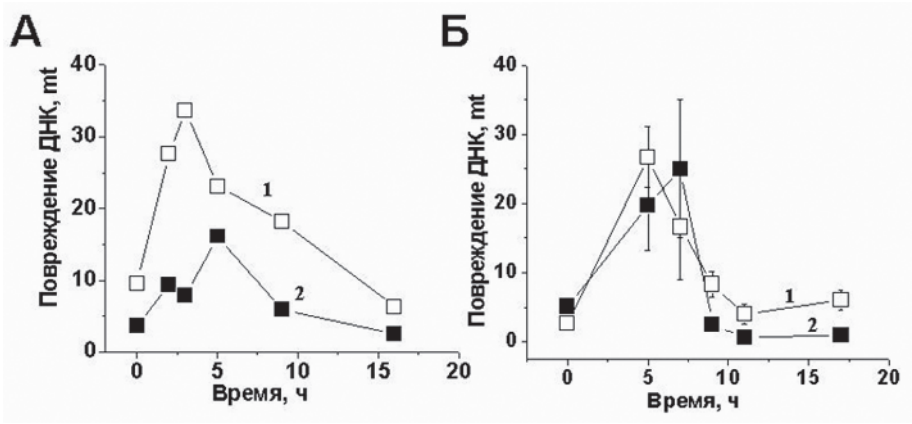


Рис. 4. Динамика репарации однонитевых (1) и двунитевых (2) разрывов ДНК в сетчатке глаза мышей *in vivo* после их облучения γ-квантами (а) и ускоренными протонами (б) в дозе 14 Гр

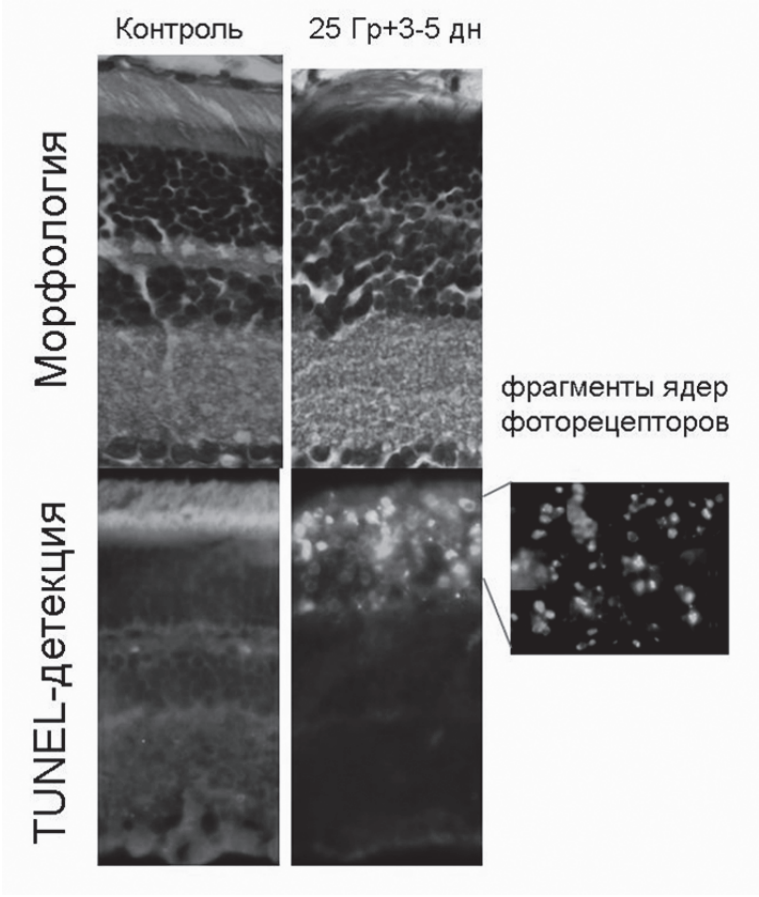


Рис. 5. Микрофотографии срезов сетчатки после локального облучения ускоренными протонами в дозе 25 Гр

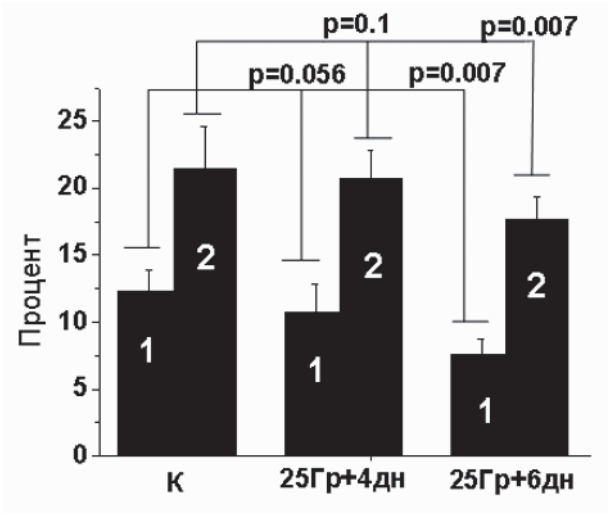


Рис. 6. Толщина слоя сегментов фоторецепторов (1) и ядерного слоя фоторецепторов (2) в интактной сетчатке глаза мышей (К) и спустя 4 и 6 дней после облучения мышей протонами в дозе 25 Гр

Толщина слоев выражена в процентах от общей толщины сетчатки. Р – уровень значимости различий с интактной сетчаткой

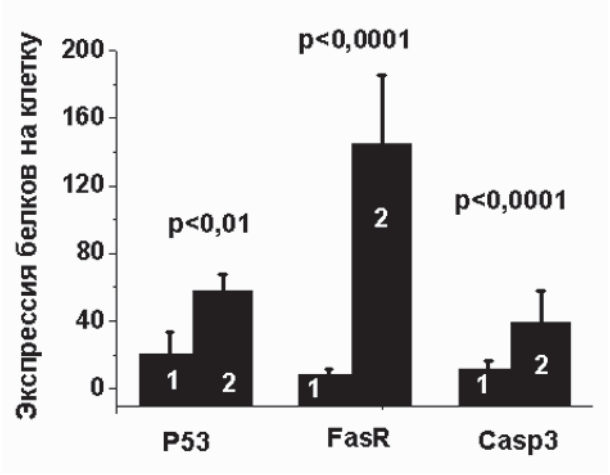


Рис. 7. Иммуноцитохимический анализ экспрессии проапоптотических белков в клетках сетчатки интактных мышей (1) и мышей через 24 ч после локального облучения ускоренными протонами в дозе 25 Гр (2)

Эти изменения достоверны (p<0,01) спустя 6 дней после облучения (см. рис. 6) и отражают нарастающую во времени гибель фоторецепторов в сетчатке глаза мышей после облучения ускоренными протонами в дозе 25 Гр.

Как показывает TUNEL-тестирование, снижение клеточности слоя фоторецепторов сопровождается их массовой гибелью (см. рис. 5). Гибель фоторецепторов после облучения протонами по механизму апоптоза подтверждается наличием в

ядерном слое фоторецепторов характерных фрагментированных ядер и ядер, содержащих конденсированный хроматин (см. рис. 5).

Облучение в дозе 25 Гр увеличивает экспрессию FasR каспазы 3 и P53 в клетках сетчатки (рис. 7). Функциональные изменения облученной 25 Гр сетчатки глаза представлены на рис. 8: снижается амплитуда ЭРГ во времени и во всем диапазоне интенсивности светового стимула.

В этом блоке экспериментов был подтвержден тезис о высокой радиоустойчивости сетчатки глаза: морфологические изменения и снижение функциональной

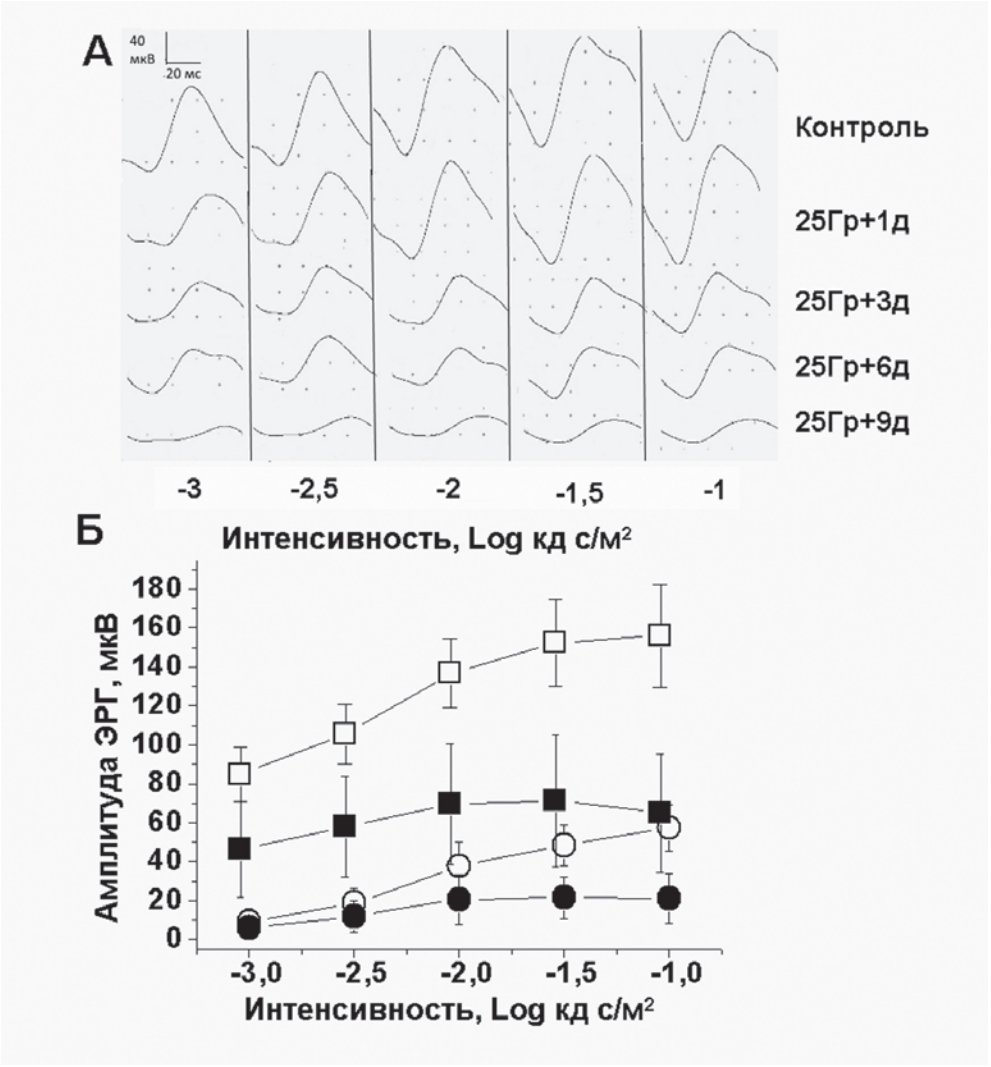


Рис. 8. Динамика изменения физиологической активности сетчатки глаза у мышей в ответ на локальное облучение протонами головы животных

А – изменение профиля ЭРГ; Б – амплитуды *a*-волны (черные кружки) и *b*-волны (черные квадраты) ЭРГ мышей в ответ на облучение в дозе 25 Гр по сравнению с контролем (белые кружки и квадраты)

активности сетчатки наблюдаются спустя несколько дней после воздействия 25 Гр и при дозе 14 Гр, не вызывающей таких изменений за время наблюдения, в ДНК сетчатки формируются радиационные разрывы, которые успешно репарируются. Симбатно с ходом репарации изменяется экспрессия генострессовых белков. Из этого наблюдения можно сделать вывод, что P53 и ATM при «низких» дозах облучения стимулируют репарацию, но не апоптоз, что оставляет возможность сетчатке восстановить структуру ДНК и параллельно с этим функцию. С возрастанием дозы облучения увеличивается поврежденность всех клеточных структур, и в ответ на это активируется процесс апоптоза фоторецепторов, наиболее чувствительных к повреждениям клеток, составляющих сетчатку. Апоптоз подтвержден возрастанием экспрессии белков, сопутствующих апоптозу (см. рис. 7) (P53, FasR, Casp3), и необратимым снижением функциональной активности сетчатки глаза (см. рис. 8А)

.

3. Ответ сетчатки глаза на введение метилнитрозомочевины

Однократное введение мышам метилнитрозомочевины (70 мг/кг) вызывает деструктивные изменения в сетчатке глаза, затрагивающие главным образом слой фоторецепторных клеток (рис. 9А). Разупорядочение и фрагментация сегментов, снижение толщины ядерного слоя фоторецепторов, наличие фрагментированных ядер фоторецепторов (рис. 9Б), увеличенная экспрессия белков, связанных с апоптозом – P53, PARP, FasR и caspase 3 (рис. 9В), указывают на прогрессирующую гибель фоторецепторов по механизму апоптоза. У многих животных отмечается слепота на 6-й день после введения агента.

Доза МНМ 70 мг/кг монотонно и необратимо снижает амплитуду ЭРГ мышей (рис. 10). Цитотоксический эффект МНМ имеет резкую концентрационную зависимость: инъекция мышам МНМ в дозе 35 мг/кг не вызывает изменений в фоторецепторном слое сетчатки (см. рис. 9А) и не сопровождается увеличением экспрессии проапоптотических белков. Однако эта доза вызывает обратимое снижение амплитуды ЭРГ (см. рис. 10).

Таким образом, особенностью ответа сетчатки на генотоксический стресс, вызванный как облучением, так и МНМ, является нелинейность зависимости цитотоксического ответа от дозы, т.е. для этих видов воздействия в сетчатке глаза обнаруживается высокий генотоксический порог. В случае пролиферирующих клеток генотоксический порог связывают с активной системой репарации ДНК.

4. Адаптивный ответ сетчатки глаза на введение метилнитрозомочевины и облучение ускоренными протонами

В предыдущих экспериментах продемонстрирована способность клеток сетчатки к восстановлению структуры ДНК от генотоксических повреждений: спустя 24–48 ч после инъекции ретинотоксической дозы МНМ (70 мг/кг) наблюдалось удаление дефектов и восстановление ДНК (рис. 11Б). Однако несмотря на полную

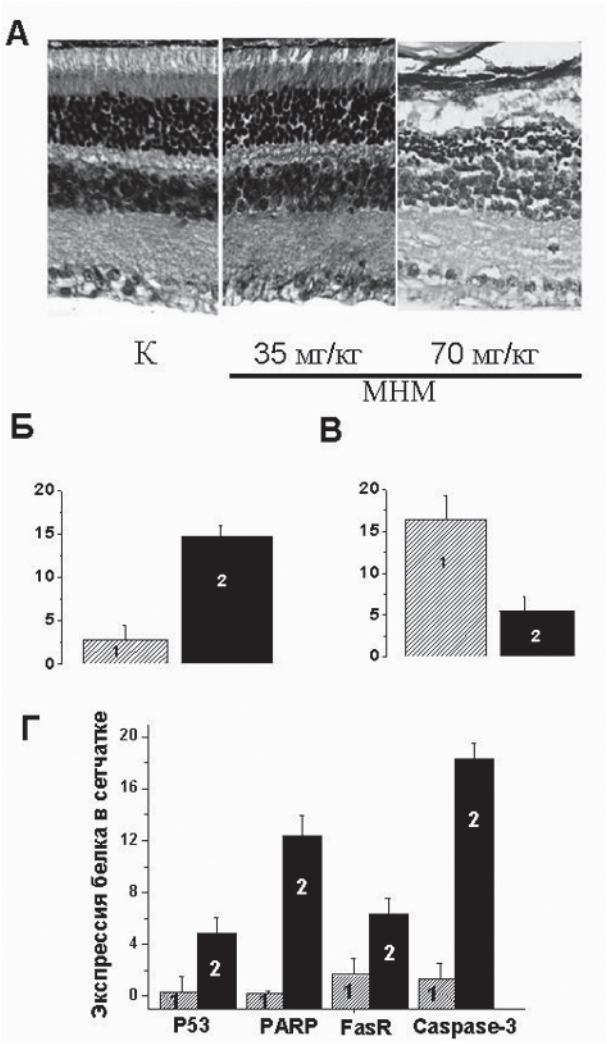


Рис. 9. Ответ сетчатки глаза у мышей на однократную инъекцию мышам метилнитрозомочевины в двух дозах (35 и 70 мг/кг)

А – микрофоторафия интактной сетчатки (К) и сетчатки через 6 дней после инъекции МНМ; Б – доля (%) фрагментированных ядер фоторецепторов в интактной сетчатке (1) и через 6 суток после инъекции МНМ (2); В – средняя толщина ядерного слоя фоторецепторов интактной сетчатки (1) и через 6 суток после инъекции МНМ (2); Г – иммуноцитохимическое определение экспрессии проапоптотических белков спустя 24 ч после инъекции МНМ (1– контроль, 2 – МНМ 70 мг/кг)

репарацию, происходила деструкция сетчатки, гибель фоторецепторов и необратимая утрата функций. Это говорит о том, что репарация ДНК от повреждений хотя и необходимое условие для клеточного восстановления сетчатки, но не является исчерпывающим показателем. В этой же части исследований мы наблюдали способность сетчатки глаза к функциональному восстановлению, но после инъекции

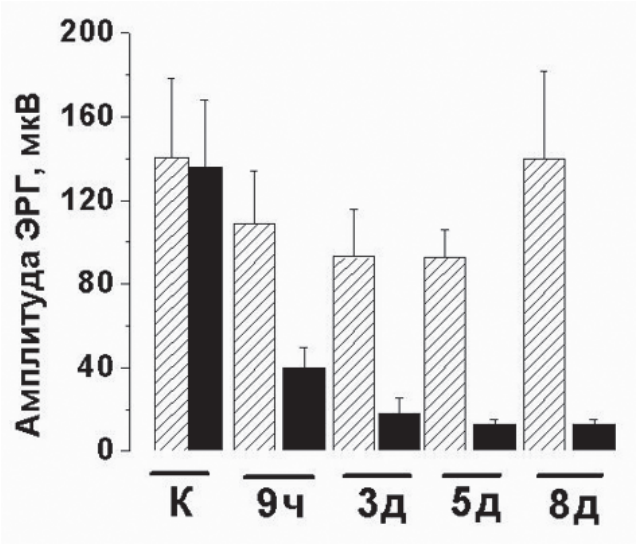


Рис. 10. Влияние МНМ на амплитуду ЭРГ у мышей спустя разное время после однократного введения агента животным в дозах 35 мг/кг (серые столбцы) и 70 мг/кг (черные столбцы)

нецитотоксической дозы МНМ 35 мг/кг (см. рис. 10). В силу сказанного в последующих экспериментах мы использовали клеточную гибель/выживаемость и функциональную активность (ЭРГ) как показатели восстановления сетчатки глаза после генотоксического воздействия.

Тактика эксперимента основана на фракционировании дозы агента и используется в токсикологии для характеристики адаптации организма к токсическому агенту (Anderson et al., 2005; Otani et al., 2012). Предполагается, что первое неток-

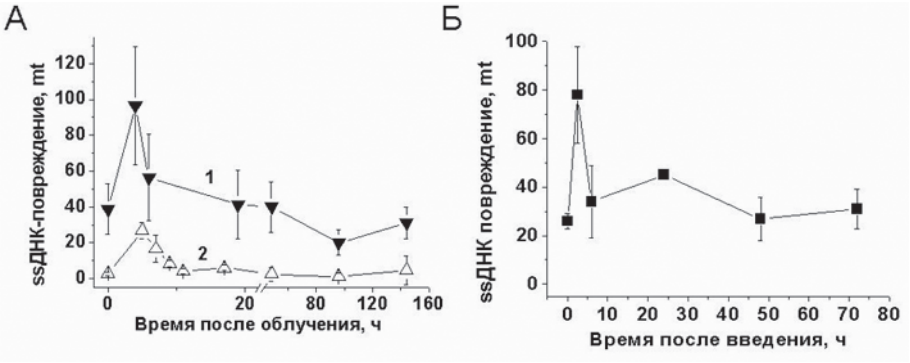


Рис. 11. Динамика репарации ssДНК в сетчатке глаза у мышей

А – у мышей, облученых ускоренными протонами в дозе 25 Гр (1 – лизис с добавлением протеиназы К, 2 – лизис без протеиназы); Б — после инъекции мышам МНМ в дозе 70 мг/кг (лизис с протеиназой)

сическое воздействие в низкой дозе, создает «защитный фон» в ткани, на котором последующее воздействие в высокой дозе становится менее токсичным. Этот эффект в литературе называется гормезисом (Luckey, 2006). Исследования состояли из двух серий экспериментов. В первой серии в качестве адаптирующего воздействия использовали низкую дозу МНМ (химический гормезис).

Рис. 12 представляет схему (А) и результат (Б) опыта по адаптивному ответу сетчатки глаза мышей на последовательное воздействие МНМ сначала в нетоксической (17 мг/кг) и спустя 4 ч в токсической дозе 70 мг/кг. На этом рисунке результат представлен в виде профилей ЭРГ (А) и гистограммой амплитуд ЭРГ (Б). Как видно, через 6 ч после воздействия МНМ в дозе 70 мг/кг профиль ЭРГ восстанавливается (ms3). Хотя амплитуда ЭРГ остается сниженной по сравнению с контрольной сетчаткой (ms1), она, тем не менее, достоверно выше амплитуды ЭРГ после единственной инъекции МНМ в дозе 70 мг/кг (ms2).

Адаптивный ответ по активации глиальных Мюллеровских клеток (ГКМ) в сетчатке глаза регистрировали спустя 48 ч после адаптирующей инъекции МНМ. Мюллеровские клетки сетчатки чутко реагируют на химическое воздействие. Ответ ГКМ (реактивный глиозис) включает в себя увеличение размера ГКМ, пролиферацию и миграцию ГКМ к поврежденным участкам сетчатки и наиболее ранимому слою фоторецепторов. Эти 3 компонента ответа на МНМ наблюдались на микросрезах в виде FITC-фокусов (рис. 13). Фокусы представляют собой пролиферирующие клетки, включившие BUdR в ДНК. Подсчет таких фокусов на единичную площадь среза дает количественную меру ответа ГКМ на стресс. В ответ на дозу 70 мг/кг (однократно) наблюдалась достоверная активация ГКМ (см. рис. 13Б).

Фракционирование дозы МНМ (17+70 мг/кг) обнаружило снижение активации ГКМ (рис. 14) по сравнению эффектом от дозы 70 мг/кг. Хотя это снижение недостоверно (P=0,08), мы обращаем внимание на уверенную тенденцию к снижению

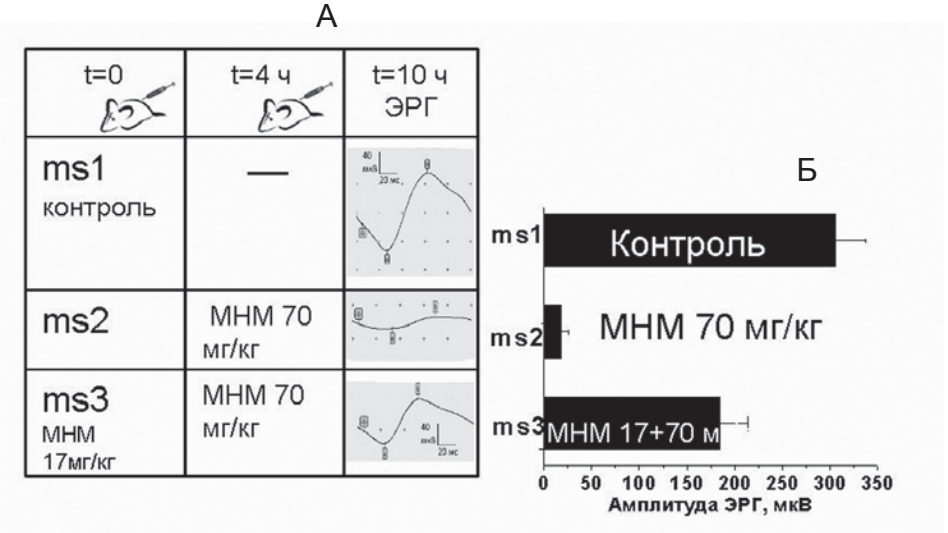


Рис. 12. Схема (А) и результат (Б) эксперимента по влиянию фракционированного (17 +70 мг/кг) введения МНМ на ЭРГ у мышей

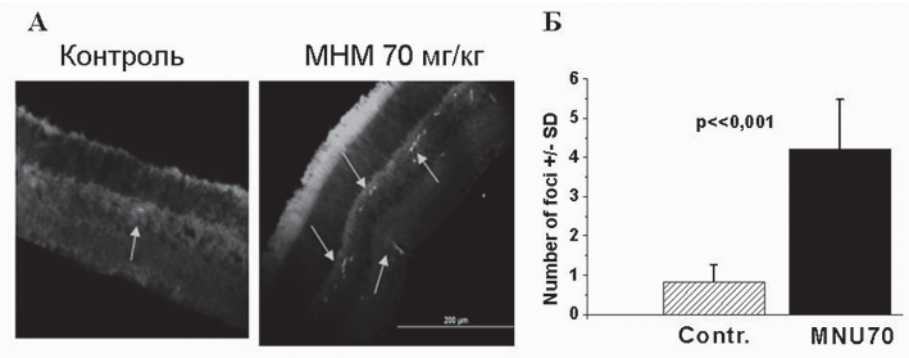


Рис. 13. Влияние МНМ на активацию клеток Мюллера в сетчатке глаза у мышей *in vivo*
А – глиальные клетки Мюллера на срезах сетчатки, меченые анти-BrUdR антителами (показаны стрелками); Б – число фокусов на единицу площади среза ±SD через 48 ч после введения однократной дозы МНМ 70 мг/кг

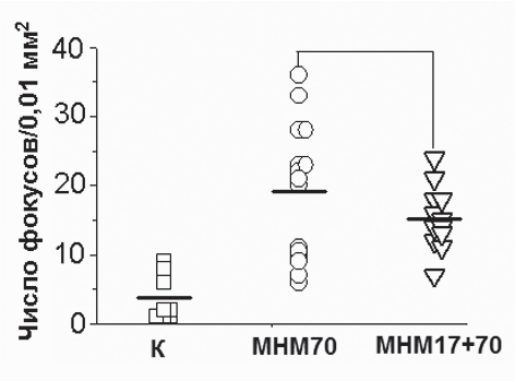


Рис. 14. Средние значения количества активированных ГКМ на единичную площадь среза сетчатки (число фокусов/0,01 мм^2 среза) в ответ на однократное (МНМ70) и фракционированное (МНМ17+70) введение МНМ мышам

активации ГКМ в сетчатке после фракционирования МНМ, что говорит о снижении повреждающего действия двух доз МНМ по сравнению с одной 70 мг/кг.

Во второй серии экспериментов в качестве адаптирующего воздействия использовалось облучение протонами головы животных в дозе 1 Гр (радиационное прекондиционирование, гормезис). Как и в предыдущей серии, вторым (ударным) воздействием была внутрибрюшинная инъекция ретинотоксической дозы МНМ 70 мг/кг.

Эвтаназия и препаративные процедуры проводились спустя 48 ч после облучения. Результаты представлены на рис. 15. Как видно, инъекция МНМ в дозе 70 мг/кг приводит к массовой гибели фоторецепторов, о чем говорит локализация TUNEL-фокусов только в наружном ядерном слое сетчатки на микрофотографии (см. рис. 15А). Это же наблюдается и на вставках микрофотографий на рис. 15Б.

Попутно отметим, что морфологическая деструкция фоторецепторного слоя сетчатки менее выражена, хотя наблюдается разупорядочение фоточувствительных

Таблица 1

Схема эксперимента по адаптирующему эффекту облучения на сетчатку глаза мышей

Время, ч	0	4	48
Мышь 1			
Воздействие	Протоны	МНМ	ЭРГ + эвтаназия
Доза	1 Гр	70 мг/кг	
Мышь 2			
Воздействие	–	МНМ	ЭРГ + эвтаназия
Доза, мг/кг	–	70	
Мышь 3			
Воздействие	Протоны	–	ЭРГ + эвтаназия
Доза, Гр	1	–	

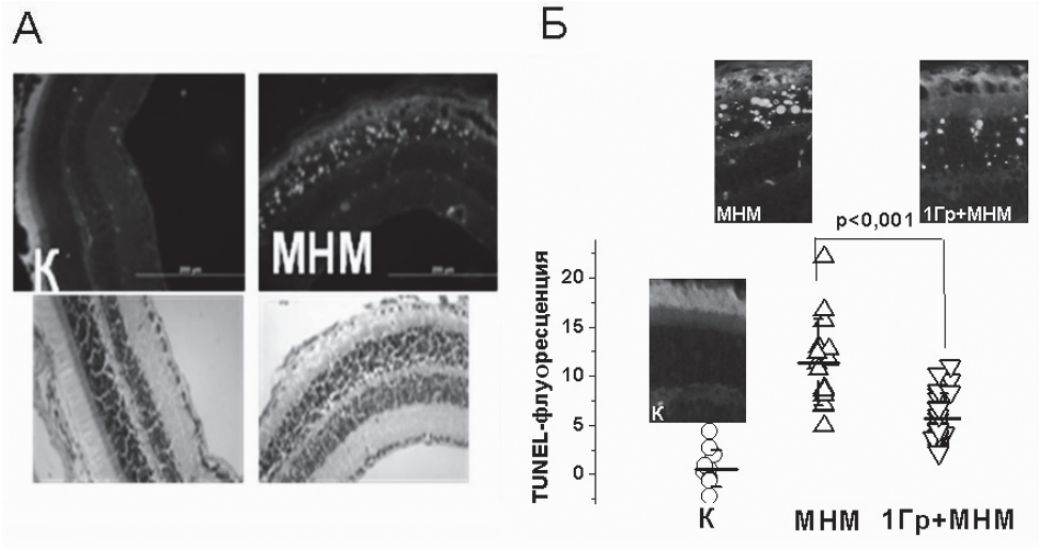


Рис. 15. Радиацианное прекондиционирование (радиационный гормезис) сетчатки глаза через 48 ч после облучения

А – морфологические изменения и TUNEL-детекция погибших клеток в срезах сетчатки; Б – интенсивность флуоресценции ядерного слоя фоторецепторов сетчатки. Представлены точки средних значений для разных срезов

сегментов фоторецепторов, т.е. апоптотическая деградация ДНК и активация эндонуклеаз в ядрах фоторецепторов сетчатки в данном случае опережает по времени морфологические изменения сетчатки примерно на 24–48 ч.

Количественная оценка интенсивности TUNEL-флуоресценции (см. рис. 15Б), проведенная с помощью программы Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html), показала достоверное снижение цитотоксичности МНМ после протонного облучения в дозе 1 Гр по сравнению с эффектом только от МНМ (уровень значимости различий $p<0,001$). Другими словами, предварительное облучение протонами головы мышей в дозе 1 Гр делает сетчатку

глаза более толерантной к цитотоксическому действию МНМ. Известно, что апоптоз в клетках инициируется двунитевыми разрывами ДНК, имеющими ферментативную природу (Разин, Юдинкова, 1998). Поскольку, как отмечалось ранее, МНМ не вызывает разрывов ДНК, то в апоптотических клетках сетчатки может наблюдаться формирование таких инициирующих апоптоз ферментативных двунитевых разрывов ДНК. Их содержание в клетках может коррелировать со средней скоростью апоптоза в сетчатке.

Как видно, полученные нами результаты оценки двунитевых разрывов ДНК в сетчатке подтверждают наши ожидания (рис. 16). Среднее содержание двунитевых разрывов ДНК в клетках сетчатки после совместного действия агентов ниже такового в сетчатке, подвергнутой действию только МНМ, что совпадает с частотой апоптоза по данным TUNEL (см. рис. 16Б, гистограммы).

5. Высокая генотоксическая устойчивость сетчатки глаза

Полученные нами результаты по облучению и действию МНМ подтверждают тезис о высокой генотоксической устойчивости зрелой сетчатки мышей. Одна из предпосылок к этому – активная репарация ДНК после действия γ- и протонного излучений в дозе 14 Гр (см. рис 7). Репарация сочетается с увеличенной экспрессией P53 и ATM, которая нормализуется спустя 12 ч после облучения, времени завершения репарации индуцированных излучениями разрывов в ДНК (см. рис. 6).

Заметные морфологические изменения в фоторецепторном слое сетчатки глаза отмечаются после облучения в дозе 25 Гр. Эти изменения выражаются в деградации наружных сегментов фоторецепторов сетчатки, а также в снижении плотности и толщины ядерного слоя фоторецепторов (см. рис. 9). Деградация нарастает во времени и связана с гибелью фоторецепторов, протекающей по механизму апоптоза. На апоптоз указывает возросшая экспрессия проапоптотических белков P53, FasR и активной каспазы 3 (см. рис. 10). Все это в совокупности наблюдается и при действии МНМ на сетчатку глаза (см. рис. 11, 14). Высокая устойчивость сетчатки и активный механизм репарации ДНК указывают на существование генотоксического порога, который обуславливает нелинейный характер зависимости эффекта от дозы (Johnson et al., 2009) агентов. На пролиферирующих клетках генотоксический порог наблюдался при действии алкилирующих агентов (Jenkins et al., 2005). Он выражался в нелинейной зависимости эффекта от дозы и прямо связан с активной системой репарации ДНК.

Исследование генотоксического действия МНМ обнаружило две ранее не описанные особенности сетчатки глаза. Во-первых, высокую спонтанную поврежденность ДНК в сетчатке глаза мышей. По этому показателю органы мыши располагаются в порядке возрастания поврежденности ДНК в клетках – лимфоциты < клетки печени < клетки мозга < клетки сетчатки, который совпадает со степенью оксигенации тканей. Средний момент хвоста ssДНК-комет интактной сетчатки, mt=32±2, соответствует дозе облучения протонами 15–20 Гр. Такая доза облучения неизбежно индуцирует заметное повреждение и dsДНК в сетчатке. Однако интак-

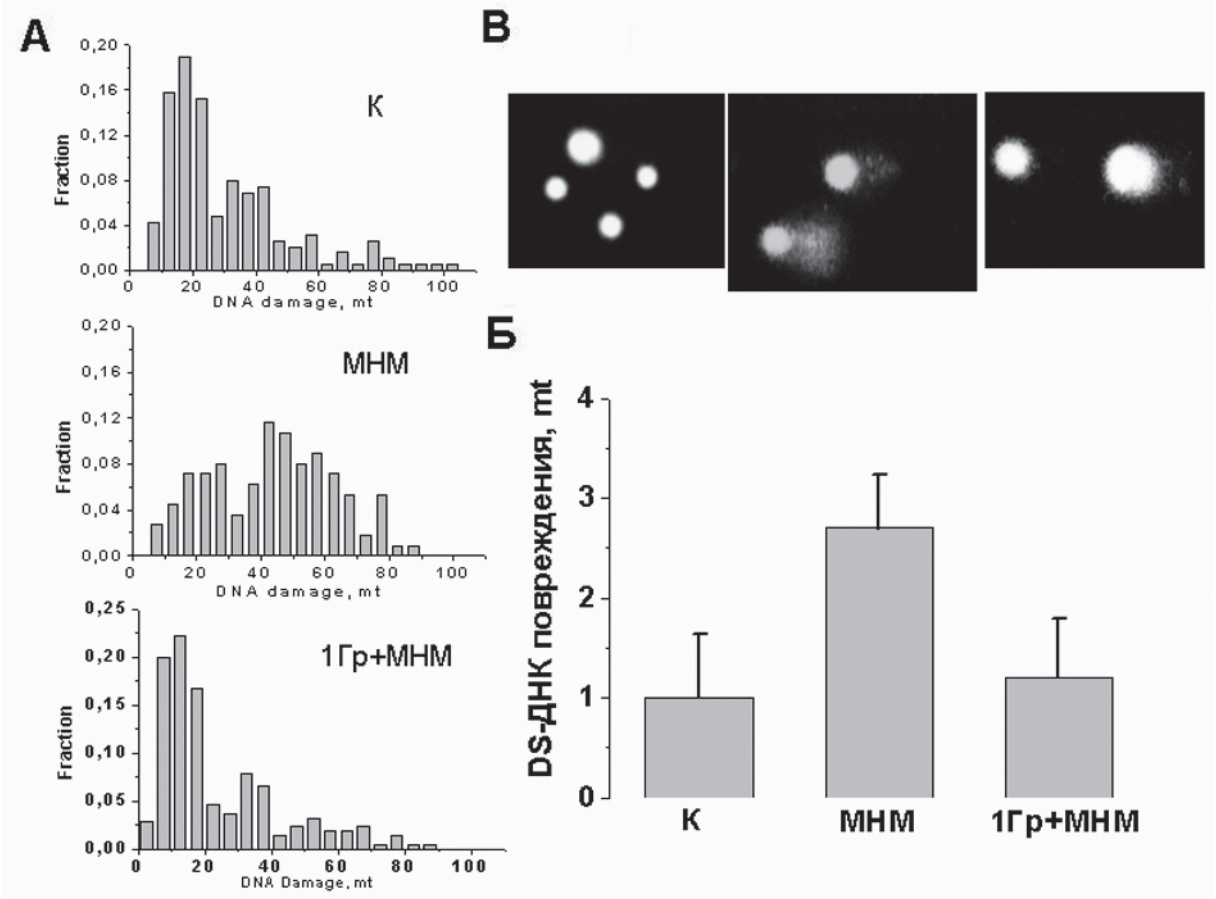


Рис. 16. Поврежденность двунитевой ДНК (dsДНК) в клетках сетчатки глаза спустя 48 ч после введения МНМ 70 мг/кг и облучения протонами (1 Гр+МНМ)

А – гистограммы распределений клеток по степени поврежденности dsДНК; Б – средние значения, найденные их этих распределений ±SD; В – микрофотографии dsДНК-комет, доминирующие в каждом из распределений

тная сетчатка в нейтральных условиях, dsДНК, не обнаруживает разрывов, хотя форма комет, напоминающая одуванчики, указывает на декомпактизацию хроматина в клетке и на ослабление его связи с ядерным матриксом. Все это говорит о том, что спонтанные повреждения ДНК в сетчатке не являются разрывами, но трансформируются в таковые в щелочных условиях (pH>13), то есть являются окси-модифицированными основаниями ДНК.

Вторая обнаруженная нами особенность сетчатки – активная репарация, удаляющая большую часть повреждений ДНК, индуцированных облучением и МНМ, но не затрагивающая предсуществующие спонтанные повреждения ДНК (см. рис. 14). Спонтанные повреждения в виде однонитевых разрывов ДНК в различных органах мышей отмечались в работах (Valarde et al., 2000, 2001). Степень поврежденности ДНК нарастала в клетках в том же порядке, что и у нас: лейкоциты < клетки печени < клетки мозга (Wang et al., 2010). Таким образом, наличие таких нерепарируемых дефектов в ДНК интактной сетчатки глаза и снижение ее функций и жизнеспособности тоже говорит о высокой генотоксической устойчивости.

Апоптоз в ответ на повреждение ДНК в пролиферирующих клетках признается радикальным способом предотвратить формирование генетически нестабильного потомства клеток. В случае дифференцированных клеток не ясно, способны ли они подвергаться апоптозу в ответ на генотоксический стресс (Simonatto et al., 2007). Известно, что в постмитотических клетках подавлены отдельные механизмы репарации. Так, терминально дифференцированные клетки не способны осуществлять репарацию по механизму гомологичной рекомбинации, ассоциированному с репликацией. Кроме того, в этих клетках регуляторно подавлена глобальная репарация генома, одна из разновидностей механизма NER (Walsh, Perlman, 1997). Вместе с тем, терминально дифференцированные клетки транскрипционно активны и нуждаются в поддержании целостности транскрибируемой части генома на протяжение жизни клетки. Эту функцию выполняет механизм репарации, ассоциированный с транскрипцией (Nouspikel, 2007). Принимая во внимание эти факты, можно считать большую часть глобального генома терминально дифференцированных клеток (в т.ч. и клеток сетчатки) некритичной для выполнения их специфических функций. Поэтому репарацией ДНК в этой части генома клетка может до какой-то степени пренебречь. В результате в ней могут накапливаться спонтанные повреждения без очевидных цитотоксических последствий. Спонтанная поврежденность ядерной ДНК в сетчатке отражает толерантность клеток к генотоксическому стрессу.

Таким образом, наши результаты показывают, что, так же как для делящихся клеток, одной из причин толерантности постмитотических клеток сетчатки к повреждениям ДНК является репарация. Вторая причина их толерантности – уменьшение физического размера радиочувствительной мишени до размеров транскрибируемого локуса генома. Мы предполагаем, что решающая роль в трансформации изначально пермиссивных повреждений ДНК (разрывов после облучения и модифицированных оснований и АП-сайтов после действия МНМ) в цитотоксическое принадлежит локализованным в транскрибируемых сайтах молекулам топоизомеразы 2 (topo 2).

Известно, что регуляция генной экспрессии осуществляется путем структурной перестройки (remodeling) хроматина и формированием петель (Kouzarides,

2007; Kadauke, Blobel, 2009). Важная роль в этом принадлежит топоизомеразе topo 2, входящей в состав комплекса, осуществляющего модификацию (Varga-Weisz et al., 1997; Kuniaki Sano et al., 2008). Topo 2 локализована в транскрибируемой области, где изменяет топологию ДНК, делая в ДНК временный двойной разрыв и лигируя его в последующем, благодаря своим эндонуклеазной и лигазной функциям (Champoux, 2001). Активацию эндонуклеазной активности topo 2 могут осуществлять как индуцированные внешним воздействием (Sabourin, Osheroff, 2000), так и спонтанно возникающие повреждения ДНК (Liu, Gerson, 2004). В результате в транскрибируемых локусах формируются нерепарируемые двунитевые разрывы, приводящие к образованию высокомолекулярных (300–0,5 Mb) фрагментов dsДНК (Taverna et al., 2001), являющихся ранним маркером апоптотической деградации генома (Tronov et al., 1999). В работе (Fishel et al., 2007) показано, что для инициации этих процессов необходимо попадание повреждения в область, перекрываемую эндонуклеазной активностью topo 2. В противном случае повреждение может быть репарировано, не вызвав цитотоксического эффекта. Этот механизм объясняет как наличие генотоксического порога и вклад репарации в его формирование, так и, в конечном счете, процесс трансформации повреждения ДНК в цитотоксический эффект в постмитотических клетках сетчатки.

6. Функциональное и структурное восстановление сетчатки глаза после генотоксического воздействия

Рассмотренная в предыдущем разделе толерантность сетчатки к генотоксическим стрессам может свидетельствовать о наличии в сетчатке механизма восстановления от повреждения. Наши данные по адаптирующему действию малых доз МНМ (см. рис. 15) и протонного излучения убедительно доказывают способность зрелой сетчатки к структурному/клеточному и функциональному восстановлению. В токсикологии такой адаптивный ответ получил название «нейрогормезис» (Luckey, 2006).

С использованием модели МНМ-индуцированной дегенерации сетчатки был продемонстрирован ретинопротекторный эффект у таких соединений, как липид, выделенный из семян древесного гриба *Ganoderma lucidum* (Gao et al., 2010), инактивированный мутацией фактор роста фибробластов (Xu et al., 2008), никотинамид (Kiuchi et al., 2003). Нейрогормезис был описан в отношении действия радиации на глаз экспериментальных животных (Anderson et al., 2005; Otani et al., 2012). У человека к подобному явлению можно отнести эпидемиологические данные о снижении частоты заболевания глаукомой в популяции людей, переживших атомную бомбардировку в Японии (Miyachi et al., 1994; Yamada et al., 2004). Как показывают наши результаты, важная роль в радиационном гормезисе принадлежит подавлению апоптоза. Известно, что наиболее активным ингибитором апоптоза в клетке является белок XIAP, кодируемый геном XIAP на 10 хромосоме (Srinivasula et al., 2001). В связи с нашими результатами представляет интерес работа (Petrin et al., 2003). В ней выделенный ген XIAP инъецировали в глаза крысам, которым после

его интеграции в геном клеток сетчатки (вектором служил аденовирус) в/б вводили МНМ. В результате клетки сетчатки, экспрессирующие белок XIAP, становились более устойчивыми к действию МНМ по частоте апоптоза и по морфологии, т.е. показано, что прямое подавление белком XIAP апоптоза в сетчатке делает ее более устойчивой к действию МНМ.

Кроме того, не исключено, что в химическом и радиационном гормезисе сетчатки глаза могут играть роль и глиальные клетки Мюллера, чутко реагирующие на различные деструктивные изменения в сетчатке (Chollangi et al., 2009).

В данной работе была продемонстрирована потенциальная способность сетчатки глаза к восстановлению от ретинотоксического действия МНМ. Эта способность выражается в структурном и функциональном восстановлении и может быть использована в терапевтических целях, а модель генотоксической индукции дегенерации сетчатки может быть с успехом применена для первичного отбора средств, препятствующих ей.

Литература

Разин С.В., Юдинкова Е.Ю. Крупномасштабная фрагментация ДНК при апоптозе: разрезается ли геном по границам топологических доменов? // Известия РАН. Биология. 1998. № 2. С. 167-171.

Anderson M.G., Libby R.T., Gould D.B., Smith R.S., John S.W. High-dose radiation with bone marrow transfer prevents neurodegeneration in an inherited glaucoma // PNAS. 2005. Vol. 102. № 12. P. 4566-4571.

Beranek D.T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents // Mutat. Res. 1990.Vol. 231. P. 11-30.

Champoux J.J. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism // Annu. Rev. Biochem. 2001. Vol. 70. P. 369-413.

Chollangi S., Wang J., Martin A., Quinn J., Ash J.D. Preconditioning-induced protection from oxidative injury is mediated by leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) and its ligands in the retina // Neurobiol. Dis. 2009. Vol. 34. № 3. P. 535–544.

Fishel M.L., He Y., Smith M.L., Kelley M.R. Manipulation of base excision repair to sensitize ovarian cancer cells to alkylating agent temozolomide // Clin. Cancer. Res. 2007. Vol. 13. № 1. P. 260-267.

Gao Y., Deng X.G., Sun Q.N., Zhong Z.Q. Ganoderma spore lipid inhibits N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal photoreceptor apoptosis *in vivo* // Exp. Eye. Res. 2010. Vol. 90. № 3. P. 397-404.

Jenkins G.J.S., Doak S.H., Johnson G.E.,Quick E, Waters E.M., Parry J.M. Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents? // Mutagenesis. 2005. Vol. 20. № 6. P. 389-398.

Johnson G.E., Doak S.H., Griffiths S.M., Quick E.L., Skibinski D.O., Zaïr Z.M., Jenkins G.J. Non-linear dose-response of DNA-reactive genotoxins: Recommendations for data analysis // Mutat. Res. 2009. Vol. 678. № 2. P. 95-100.

Kadauke S., Blobel G.A. Chromatin loops in gene regulation // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1789. № 1. P. 17-25.

Kiuchi K., Kondo M., Ueno S., Moriguchi K., Yoshizawa K., Miyake Y., Matsumura M., Tsubura A. Functional rescue of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinopathy by nicotinamide in Sprague-Dawley rats // Curr. Eye Res. 2003. Vol. 26. № 6. P. 355-362.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their functions// Cell. 2007. Vol. 128. № 4. P. 693-705.

Kuniaki Sano K., Miyaji-Yamaguchi M., Tsutsui K.M., Tsutsui K. Topoisomerase IIβ Activates a Subset of Neuronal Genes that Are Repressed in AT-Rich Genomic Environment // PLoS One. 2008. Vol. 3. № e4103. P. 1-17.

Lips J., Kaina B. DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts // Carcinogenesis. 2001. Vol. 22. № 4. P. 579-585.

Liu L., Gerson S.L. Therapeutic impact of methoxyamine: blocking repair of abasic sites in the base excision repair pathway // Curr. Opin. Investig. Drugs. 2004. Vol. 5. № 6. P. 623-627.

Luckey T.D. Radiation hormesis: the good, the bad, and the ugly // Dose Response. 2006. Vol. 4. № 3. P. 169-190.

Marc R.E., Jones B.W., Watt C.B., Strettoi E. Neural remodeling in retinal degeneration // Prog. Retin. Eye Res. 2003. Vol. 22. № 5. P. 607-655.

Marigo V. Programmed cell death in retinal degeneration: targeting apoptosis in photoreceptors as potential therapy for retinal degeneration // Cell Cycle. 2007. Vol. 6. № 6. P. 652-655.

Miyachi Y., Kasai H., Ohyama H., Yamada T. Changes of aggressive behavior and brain serotonin turnover after very low-dose X-irradiation of mice // Neurosci. Lett. 1994. Vol. 175. № 1-2. P. 92-94.

Moertel H., Georgi J.C., Distel L. et al. Effects of low energy protons on clonogenic survival, DSB repair and cell cycle in human glioblastoma cells and B14 fibroblasts // Radiother. Oncol. 2004. Vol. 73. Suppl. 2. P. 115-118.

Nouspikel T. DNA repair in differentiated cells: some new answers to old questions // Neuroscience. 2007. Vol. 145. № 4. P. 213-1221.

Otani A., Kojima H., Guo C., Oishi A., Yoshimura N. Low-dose-rate, low-dose irradiation Delays neurodegeneration in a model of retinitis pigmentosa // Am. J. Pathol. 2012. Vol. 180. № 1. P. 328-336.

Petrin D., Baker A., Coupland S.G. et al. Structural and Functional Protection of Photoreceptors from MNU-Induced Retinal Degeneration by the X-Linked Inhibitor of Apoptosis // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003. Vol. 44. № 6. P. 2757-2763.

Sabourin M., Osheroff N. Sensitivity of human type II topoisomerases to DNA damage: stimulation of enzyme-mediated DNA cleavage by abasic, oxidized and alkylated lesions // Nucleic. Acids. Res. 2000. Vol. 28. № 9. P. 1947-1954.

Simonatto M., Latella L., Puri P.L. DNA damage and cellular differentiation: more questions than responses // J. Cell. Physiol. 2007. Vol. 213. № 3. P. 642-648.

Srinivasula S.M., Hegde R., Saleh A. et al. A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulate caspase activity and apoptosis // Nature. 2001. Vol. 410. № 6824. P. 112-116.

Taverna P., Liu L., Hwang H., Hanson A.J., Kinsella J., Gerson S.L. Methoxyamine potentiates DNA single strand breaks and double strand breaks induced by temozolomide in colon cancer cells // Mutat. Res. 2001. Vol. 485. № 4. P. 269-281.

Tronov V.A., Konoplyannikov M.A., Nikolskaya T.A., Konstantinov E.M. Apoptosis of unstimulated human lymphocytes and DNA strand breaks induced by the topoisomerase II inhibitor etoposide (VP-16) // Biochemistry (Mosc). 1999. Vol. 64. № 3. P. 345-352.

Tsubura A., Yoshizawa K., Kuwata M., Uehara N. Animal models for retinitis pigmentosa induced by MNU; disease progression, mechanisms and therapeutic trials // Histol. Histopathol. 2010. Vol. 25. № 7. P. 933-944.

Valarde M., Fortoul T.I., Diaz-Barriga F., Mejia J., et al. Castillo E.R. Induction of genotoxicity by cadmium chloride inhalation in several organs of CD-1 moice // Mutagenesis. 2000. Vol. 15. № 2. P. 109-114.

Valarde M., Trejo C., Rojas E. Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? // Mutagenesis. 2001. Vol. 16. № 3. P. 265-270.

Varga-Weisz P.D., Wilm M., Bonte E., Dumas K., Mann M., Becker P.B. Chromatin-remodelling factor CHRAC contains the ATPases ISWI and topoisomerase II // Nature. 1997. Vol. 388. № 6642. P. 598-602.

Walsh K., Perlman H. Cell cycle exit upon myogenic differentiation // Curr. Opin. Genet. Dev. 1997. Vol. 7. № 5. P. 597-560.

Wang A.,L., Lukas T.J., Yuan M., Neufeld A.H. Age-related increase in mitochondrial DNA damage and loss of DNA repair capacity in the neural retina // Neurobiol. Aging. 2010. Vol. 31. № 11. P. 2002-2010.

Xu G. Z. Apoptosis in human degenerations // Trans. Am. Ophthalmol. Soc. 1996. Vol. 9. P. 411-430.

Xu H., Yang J.N., Li X.K., Zheng Q., Zhao W., Su Z.J., Huang Y.D. Retina protective effect of acidic fibroblast growth factor after canceling its mitogenic activity // J. Ocul. Pharmacol. Ther. 2008. Vol. 24. № 5. P. 445-51.

Yamada M., Wong F.L., Fujiwara S., Akahoshi M., Suzuki G. Noncancer disease incidence in atomic bomb survivors. 1958-1998 // Radiat. Res. 2004. Vol. 161. № 6. P. 622-632.

Часть IV

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ, ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИЮ ЗАБОЛЕВАНИЙ МОЗГА

Глава 1

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы: физиологические функции и роль в нейродегенеративных процессах

Е.В. Крюкова, И.В. Шелухина, М.Н. Жмак, А.В. Осипов, Д. Кудрявцев, Л. Оджомоко, И.Е. Кашеверов, Ю.Н. Уткин, В.И. Цетлин

Содержание

1. Введение
2. Общие данные о никотиновых ацетилхолиновых рецепторах: структура, подтипы, локализация
3. Участие нАХР нейронального типа в развитии нейродегенеративных заболеваний
4. Новые лиганды Cys-петельных рецепторов и путь к лекарствам
5. Заключение

1. Введение

Никотиновый ацетилхолиновый рецептор (нАХР, или общепринятое английское сокращение nAChR) – один из наиболее изученных в структурно-функциональном плане нейрорецепторов. Он принадлежит к большому «*Cys*-петельному» семейству лиганд-управляемых ионных каналов, к которому относится глициновый рецептор (GlyR), а также ионотропные подтипы серотонинового рецептора (5HT3) и рецептора γ-аминомасляной кислоты (GABA-A рецептор).

нАХР являются пентамерными интегральными мембранными белками, формирующими катион-селективный канал (Hucho, Weise, 2001). По локализации в организме принято разделять нАХР на две основные группы: мышечного и нейронального типа (Lindrstom, 2003). С нАХР взаимодействуют соединения разной природы – от низкомолекулярных веществ до пептидов и небольших белков. Среди наиболее известных (и исторически самых первых) были полипептидные α-нейротоксины из ядов змей – антагонисты некоторых типов холинорецепторов.

Сокращения: АХСБ – ацетилхолин-связывающий белок; БА – болезнь Альцгеймера; БП – болезнь Паркинсона; ДА – ергичность–дофаминергичность; нАХР – никотиновый ацетилхолиновый рецептор; GABA – А-рецептор – рецептор γ-аминомасляной кислоты; GlyR – глициновый рецептор; 5HT3 – серотониновый рецептор.

Именно с их помощью был впервые очищен нАХР из *Torpedo* (Cohen et al., 1972), затем нейрональный холинорецептор из мозга крысы (Eldefrawi et al., 1973), а еще позднее и ацетилхолин-связывающий белок (АХСБ) из моллюска *L. stagnalis* (Smit et al., 2001). Сейчас в дополнение к α-нейротоксинам все чаще применяются небольшие токсические пептиды, выделенные из яда морских улиток семейства *Conus* – так называемые α-конотоксины. Причиной служит высокая селективность α-конотоксинов по отношению к разным подтипам нАХР, а также сравнительная простота их химического синтеза.

Задача настоящего обзора – дать краткую информацию о никотиновых ацетилхолиновых и некоторых других Cys-петельных рецепторах, их роли в нормальных физиологических процессах, а также о вовлеченности в различные заболевания. Последним обстоятельством объясняется необходимость четко установить уровни экспрессии определенных подтипов нАХР в тканях в норме и при патологиях, так как пути лечения могут быть связаны с ингибированием или дополнительным активированием данного рецептора. Выполнение такой задачи, а также создание новых лекарств трудно представить без достаточно детальной информации о пространственной структуре рецепторов и сведений о механизме их действия. Для исследований в ИБХ РАН традиционным является использование для этих целей белковых и пептидных нейротоксинов в качестве высокочувствительных инструментов, и поэтому наши соответствующие работы будут отражены в данном обзоре.

2. Общие данные о никотиновых ацетилхолиновых рецепторах: структура, подтипы, локализация

Структурно-функциональные исследования нАХР начались несколько десятилетий назад благодаря наличию в природе богатого источника этого рецептора – электрического органа скатов *Torpedo* (*T. marmorata* или *T. californica*), а также высокоактивному и селективному блокатору этого рецептора – α-бунгаротоксину из яда крайта *Bungarus multicinctus*. Именно такое сочетание позволило охарактеризовать нАХР из *Torpedo,* представляющий собой олигомерный белок с молекулярной массой в 220 кДа, состоящий из 5 субъединиц (двух α1- и по одной β1-, γ- и δ-). Благодаря доступности природного нАХР *Torpedo* именно этот рецептор в течение многих лет широко исследовался во многих лабораториях мира. Все 5 субъединиц располагаются в мембране вокруг ионного канала, проходящего по центральной оси. Два лиганд-связывающих участка холинергических агонистов и конкурентных антагонистов при этом располагаются в областях контакта больших N-концевых внеклеточных доменов двух α1- и соседних с ними γ- и δ-субъединиц рецептора примерно на половине их высоты. Подробную информацию о никотиновых ацетилхолиновых рецепторах можно найти в недавних обзорах (Tsetlin et al., 2009; Taly et al., 2009).

Для нАХР из электрического органа ската *Torpedo marmorata* имеется криоэлектронно-микроскопическая структура с разрешением 4Å (Unwin, 2005). На схеме (рис. 1) хорошо виден наружный лиганд-связывающий домен, трансмембран-

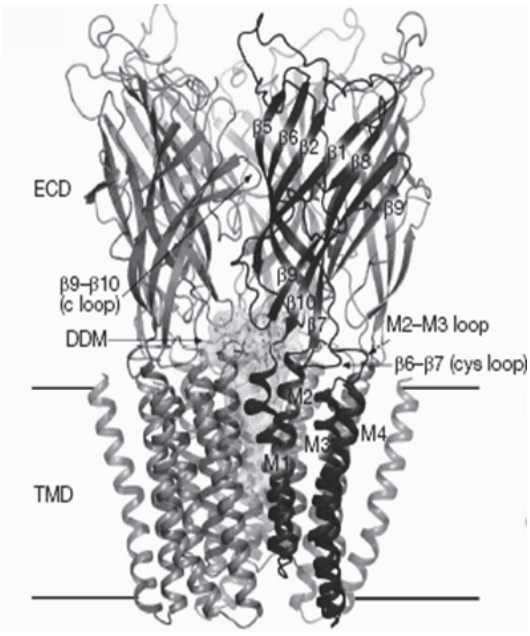


Рис. 1. Структура нАХР *Torpedo marmorata* по данным криоэлектронной микроскопии
LBD – наружный лиганд-связывающий домен, TMD – трансмембранный домен, CYD- цитоплазматический домен. Под каждой структурой указан ее код в PDB-банке

ный домен, а также часть цитоплазматического домена. Следует напомнить, что в никотиновых рецепторах каждая субъединица между трансмембранными фрагментами М3 и М4 имеет большую цитоплазматическую петлю размером около 150 аминокислотных остатков, которая в наименьшей степени консервативна, и в ней преобладает неупорядоченная структура (Kukhtina et al., 2006). Последнее обстоятельство, по-видимому, и не позволяет пока добиться кристаллизации нАХР *Torpedo* или какого-либо иного Cys-петельного рецептора млекопитающих. Другим препятствием служит Cys-петля, которая чрезвычайно гидрофобна в рецепторах млекопитающих – из-за этого не удалось закристаллизовать и их изолированные лиганд-связывающие домены, тогда как существенно меньшая гидрофобность Cys-петли в АХСБ была одним из решающих факторов успешной кристаллизации.

По фармакологическим и структурным характеристикам нАХР *Torpedo* относят к холинорецепторам мышечного типа. Рецепторы из мышечных тканей млекопитающих содержат в своем составе γ-субъединицу только на первых этапах развития организма, а у взрослых форм она замещается на ε-субъединицу. Прямых данных о пространственной структуре мышечного нАХР пока нет, но многочисленные косвенные данные свидетельствуют о сходной с рецептором *Torpedo* «пента-субъединичной» организации ионного канала.

С использованием α-бунгаротоксина позднее в мозге млекопитающих был обнаружен новый «нейрональный» нАХР (Salvaterra, Mahler, 1976) – гомоолигомерный α7 подтип рецептора, состоящий из 5 одинаковых α7-субъединиц. В нервных тканях были обнаружены и другие подтипы нАХР. К настоящему времени извес-

тны 9 нейрональных α-субъединиц (α2–- α10) и 3β-субъединицы (β2–β4), которые образуют как гомоолигомерные формы нАХР (из α7-, также из а8- или а9-субъединиц), так и гетеромерные (состоящие из различных комбинаций α- и β-субъединиц). Наиболее распространенными в нервных тканях являются α4β2, α7, α3α6β2, нАХР и некоторые другие подтипы. Пространственные структуры нейрональных нАХР пока не установлены.

Нейрональные нАХР были обнаружены и в пресинаптических областях (в отличие от нАХР мышечного типа, выявленных только в постсинаптической мембране нервно-мышечного сочленения), где они регулируют выброс везикул с различными нейротрансмиттерами. Субъединицы нейрональных нАХР были обнаружены и в самых разных «не-нейрональных» тканях и органах (клетках иммунной системы, легких, коже) (Conti-Fine et al., 2000; Sciamanna et al., 1997; Kumar, Meizel, 2005), где они могут быть сопряжены с рядом патологических состояний. Нарушение работы некоторых подтипов нАХР может вызывать или быть следствием ряда заболеваний, таких как мышечные дистрофии (миастении) (Vincent et al., 2000*)* и некоторые виды эпилепсии (Steinlein, 2004) и шизофрении (Ripoll et al., 2004). α7нАХР, экспрессированные на пресинаптических мембранах нейронов и на астроцитах, участвуют в высвобождении таких нейромедиаторов, как глутамат и γ-аминомасляная кислота (Alkondon et al., 1996; MacDermott et al., 1999), они подавляют экспрессию и встраивание в мембраны NMDA-рецепторов. В этом, вероятно, большую роль играет высокая проницаемость этих рецепторов для кальция – важного внутриклеточного сигнального агента.

3. Участие нАХР нейронального типа в развитии нейродегенеративных заболеваний

Самая ранняя гипотеза, объясняющая причины возникновения открытой более ста лет назад болезни Альцгеймера (БА) – «холинергическая». Согласно этой теории, развитие заболевания связано с недостаточным синтезом ацетилхолина в структурах головного мозга. Гипотеза потеряла поддержку в научном сообществе, когда многочисленные препараты, призванные компенсировать дефицит ацетилхолина, продемонстрировали низкую терапевтическую эффективность. Однако взаимосвязь болезни Альцгеймера и холинэргической передачи, пусть не столь явная, представляется совершенно очевидной ввиду многочисленных и разнообразных экспериментальных данных.

При БА отмечается нарушение холинергической системы, в том числе изменение количества разных типов нАХР в головном мозге без снижения общего количества нейронов. Наиболее подвержены данному явлению гиппокамп, неокортикальная зона, ядра таламуса. Высказывались предположения об участии α3-, α4-, α7- и α4β2-типа АХР в патогенезе БА (Court et al., 2001). Во многих работах демонстрируется понижение содержания нейронального АХР α7-типа в коре и гиппокампе больных. Данные относительно изменения уровня α7 нАХР в процессе развития заболевания довольно противоречивы, что может отражать индивидуаль-

ные особенности пациентов либо несовершенство методов анализа распределения рецепторов в тканях (Dineley et al., 2001).

Главным биохимическим признаком БА является накопление β-амилоидного белка, что приводит к нейродегенерации. Данный белок токсичен, и даже при низких концентрациях вызывает нарушение холинергической передачи (Gotti, Clement, 2004). Один из предполагаемых механизмов развития заболевания заключается в том, что βА связывается с α7-субъединицей АХР и через механизм эндоцитоза проникает внутрь нейрона, приводя к лизису клетки и к формированию на ее месте амилоидной бляшки (D'Andrea et al., 2002). Данная идея получила подтверждение в патенте США, в котором предложен подход к ингибированию образования этого комплекса с помощью ряда органических соединений, активность которых была показана в различных тестах *in vitro* (Reitz et al., 2006).

При изучении постмортальных образцов гиппокампа пациентов с БА методы иммунопреципитации показали, что α7-рецепторы связывают β-амилоидный белок Аβ в пикомолярной концентрации (Wang et al., 2000; Dineley, 2007). Следует отметить, что долгое время существовали противоречивые данные как об ингибирующем, так и об активирующем действии β-амилоидного белка на нативные и гетерологически экспрессированные α7 нАХР (Gotti, Clementi, 2004). Недавно было показано, что α7-субъединица в составе гетеропентамерного α7β2 нАХР агрегирует с процессированным амилоидным пептидом с аффинностью, сопоставимой с концентрацией этого растворимого пептида в некоторых областях мозга. При этом происходит активация рецептора (Parri et al., 2011). При развитии БА, когда концентрация амилоидного пептида возрастает экспоненциально, это может приводить к ингибированию α7-рецептора, что, предположительно является одним из путей развития болезни.

Можно заключить, что одним из важных аспектов нарушения деятельности нервной системы у страдающих БА являются изменения в распределении и функционировании никотиновых рецепторов в головном мозге, в частности рецепторов α7-типа. В пользу этого свидетельствуют многочисленные сведения о взаимодействии данных рецепторов с амилоидным пептидом (см. обзоры: Hernandez, Dineley, 2012; Oz et al., 2013).

Нарушение функционирования нигростриатной дофаминергической (ДА-ергической) системы и ее холинергической регуляции приводит к нарушению моторной функции. Примером такого рода патологии может служить болезнь Паркинсона (БП), ключевым элементом патогенеза которой является дегенерация нигростриатных ДА-ергических нейронов, сопровождающаяся изменением экспрессии и функциональной активности различных подтипов нАХР (Quik et al., 2007). Как уже отмечалось, подавляющее количество нейрональных нАХР локализованы на пресинаптической мембране нейронов и имеют регуляторную функцию. Они участвуют в механизмах пластичности мозга, модулируя кальций-зависимый выброс нейромедиаторов, в том числе дофамина (Changeux, 2010). На терминалях ДА-ергических нейронов в стриатуме обнаружена мРНК α3-, α4-, α5-, α6-, α7-, β2-, β3-субъединиц нАХР, а также небольшие количества мРНК β4 субъединицы (Azam et al., 2002; Klink et al., 2001). Различные комбинации этих субъединиц могут обра-

зовывать целый ряд подтипов нАХР с разными фармакологическими свойствами. На основании исследований, включавших радиолигандный анализ, иммунопреципитацию, использование мышей, нокаутных по генам ряда субъединиц нАХР, было высказано предположение, что на терминалях ДА-ергических нейронов стриатума экспрессируются пять различных подтипов нАХР: α4β2, α4α5β2, α4α6β2β3, а6β2β3 и α6β2 (Grady et al., 2010). Эти же субъединицы регулируют выброс ДА из синаптосом (Grady et al., 2007). Об участии нАХР в патогенезе БП свидетельствует тот факт, что частота заболеваемости БП в среде курящих людей гораздо ниже, чем в среде некурящих (Thacker et al., 2007). Никотин оказывает значительно влияние на ДА-ергические нейроны нигростриатной системы, стимулируя экспрессию гена тирозингидроксилазы – фермента, лимитирующего скорость синтеза ДА, и способствуя выбросу ДА (Serova, Sabban, 2002; Radcliffe et al., 2009). Разрушение ДА-ергических терминалей при БП сопровождается уменьшением количества нАХР (Quik, 2004). Стимуляция нАХР может увеличить выброс ДА сохранившимися терминалями, что приведет к улучшению моторных функций. В дальнейших исследованиях на экспериментальных моделях острой клинической стадии БП было показано, что никотин, действуя через α4- и α7-рецепторы, обладает нейротекторным влиянием на нигростриатные ДА-ергические нейроны (Quik et al., 2007). Так, инъекция мышам никотина перед введением нейротоксина МФТП препятствовала дегенерации ДА-ергических нейронов (Janson et al., 1992). Однако роль никотина в уменьшении симптомов БП у пациентов пока остается неясной. Результаты применения никотина в виде жевательной резинки или пластыря показывают значительную зависимость от способа, дозы получаемого никотина, а также типа исследовании (Quik et al., 2007). Позитивные результаты наблюдались при открытом исследовании и, напротив, при двойном слепом методе позитивных результатов не показано (Quik et al., 2007). Защитное действие никотина обнаружено также *in vitro* – на культурах клеток блокировалась токсичность ряда соединений (Akaike et al., 2010; Muñoz et al., 2012).

4. Новые лиганды *Cys*-петельных рецепторов и путь к лекарствам

Необходимость детекции и воздействия на отдельные подтипы нАХР определяет необходимость поиска и создания новых высокоаффинных и селективных лигандов. Основой служат многочисленные известные соединения, взаимодействующие с разными участками нАХР: агонисты, конкурентные антагонисты, блокаторы ионного канала, а также разнообразные модуляторы холинергической активности. Такое разнообразие, то есть способность связывать различные классы соединений, служит вероятным объяснением участия нАХР в самых различных физиологических процессах. Хорошо известно, что связывание агонистов с ортостерическими участками рецептора приводит к серии его конформационных изменений, которые в свою очередь вызывают открытие ионного канала. Конкурентные антагонисты (включая белковые и пептидные нейротоксины) тоже взаимодействуют с участком

связывания агонистов, но при этом предотвращают активацию рецептора. На холинорецепторах выявлены и другие участки взаимодействия с рядом соединений, которые вызовут ослабление или усиление ионных токов. Последние, так называемые позитивные аллостерические модуляторы (PAM), в настоящее время представляют большой интерес как возможные лекарственные средства нового поколения. Перспективными мишенями для лекарственных препаратов могут оказаться нАХР, содержащие α7-субъединицы. Показано, что введение селективного агониста α7 нАХР оказывало нейропротекторный эффект у крыс с моделью паркинсонизма, индуцированной 6-гидроксидофамином (Suzuki et al., 2013). Новый класс соединений для лечения нейродегенеративных заболеваний могут представлять также аллостерические модуляторы, усиливающие ответы α7- и α4β2 подтипов нейрональных нАХР или частичные агонисты нАХР (Weltzin, Schulte, 2010; Henderson et al., 2011). К последним может быть отнесен варениклин – препарат, который сравнительно недавно стал использоваться в качестве средства, помогающего избавиться от никотиновой зависимости (Turner et al., 2010).

Как уже отмечалось, ранее наиболее востребованными инструментами изучения структурно-функциональных свойств нАХР служили α-нейротоксины из ядов змей, благодаря своему исключительно высокому сродству к некоторым подтипам рецептора. Однако не для всех нАХР имеются избирательно действующие на них нейротоксины змей. Так называемые «короткие» а-нейротоксины эффективно взаимодействуют только с мышечными нАХР; α-нейротоксины «длинного» типа узнают кроме мышечных также инейрональные гомоолигомерные (α7, α8, α9) холинорецепторы (см. обзор Tsetlin, 1999). Еще один токсический полипептид из яда *B. multicinctus* – к-бунгаротоксин – специфичен к гетероолигомерному α3β2 нАХР. α-конотоксины, пептиды из яда морских улиток семейства *Conus*, являются конкурентными антагонистами нАХР и имеют высокую избирательность действия на различные подтипы холинорецепторов (см. обзоры: Terlau, Olivera, 2004; Han et al., 2008; Tsetlin, Hucho, 2009).

Хотя природа дала нам большое количество соединений, различающих тот или иной тип *Cys*-петельных рецепторов, задачи поиска и конструирования новых представителей, которые с большей избирательностью помогали бы идентифицировать, а также активировать или дезактивировать интересующий подтип определенного (например нАХР) рецептора, остаются по-прежнему актуальными. В связи с важной ролью α7 нАХР много усилий было потрачено на то, чтобы модифицировать природные α-конотоксины и получить аналоги, пригодные для идентификации этих рецепторов в тканях. Это недавно удалось американским исследователям: на основе природного α-конотоксина ArIB были получены его аналоги с несколькими заменами, несущими радиоактивные и флуоресцентные метки, вполне пригодные для надежного детектирования α7 нАХР (Hone et al., 2010). Нам удалось на основе α-конотоксина PnIA получить аналог, имеющий очень высокое (0,5 nM) сродство к АХСБ *L. stagnalis*, а его радиоиодированное производное очень удобно для скрининга соединений с возможной холинергической активностью (Kasheverov et al., 2011).

Выход на новые природные соединения, которые могли бы сыграть роль инструментов в изучении рецепторов, сегодня имеется благодаря протеомным исследова-

ниям ядов. Так, из яда кобры *Naja kaouthia* нами выделен димерный α-кобратоксин (Osipov et al., 2008), в котором две молекулы α-кобратоксина соединены двумя межмолекулярными дисульфидными связями, образовавшимися за счет межмолекулярной перегруппировки дисульфидных связей, имевшихся в исходном α-кобратоксине (рис. 2). Вывод о пространственной структуре этого нового нейротоксина и расположении дисульфидных связей был нами сделан на основании установления его кристаллической структуры (Osipov et al., 2012). Уже давно был известен к-бунгаротоксин, в котором две молекулы, сходные с α-бунгаротоксином, образуют прочно связанный димер, не содержащий каких-либо межмолекулярных ковалентных связей. к-Бунгаротоксин имеет высокое сродство к гетеромерному нейрональному α3β2 нАХР, тогда как α-бунгаротоксин или α-кобратоксин блокируют только мышечный и α7 нАХР. Обнаруженный нами димерный α-кобратоксин сохранил эти исходные активности, но и приобрел способность к блокированию α3β2 нАХР (Osipov et al., 2008, 2012).

До сих пор мы рассматривали выделенные из ядов нейроактивные белки и пептиды, мишенью для которых служат различные нАХР. Чуть более 10 лет назад американскими исследователями в мозге мыши был обнаружен ген, кодирующий белок Lynx1, предположительно имеющий ту же трехпетельную структуру, что и α-нейротоксины змей (Miwa et al., 1999). Структура гена указывает, что эндогенный белок млекопитающих Lynx1 должен иметь и существенное отличие от нейротоксинов – дополнительный гликозил-фосфатидил-инозитольный (GPI) якорь. С помощью этого якоря Lynx1 прикреплен в мозге к мембране в непосредственной бли-

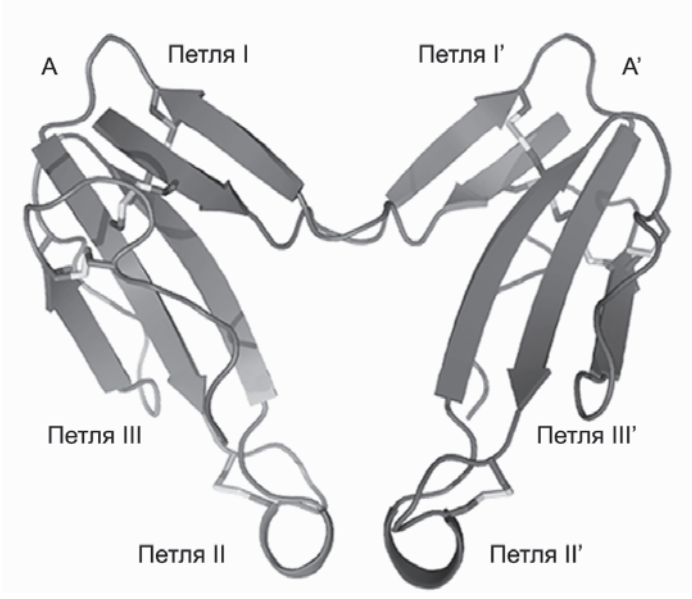
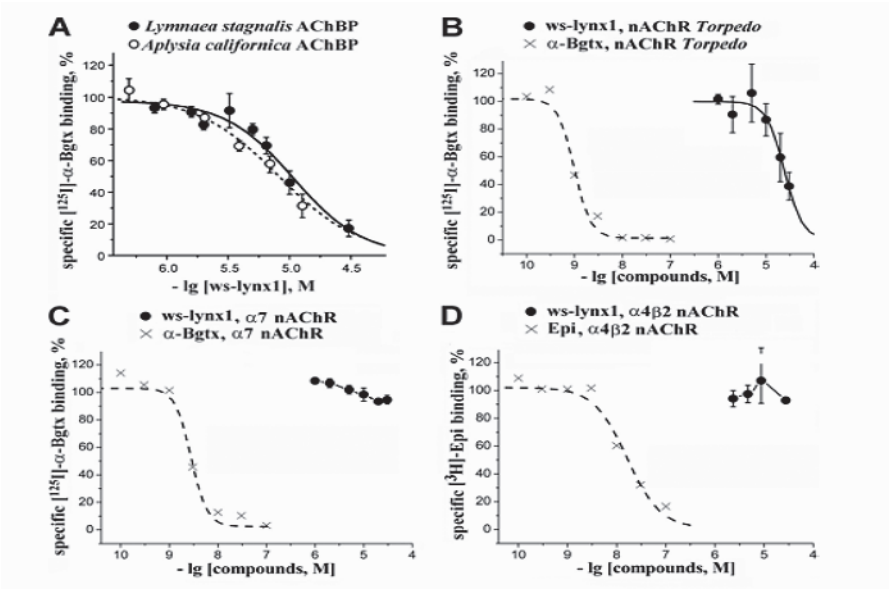


Рис 2. Кристаллическая структура димерного α-кобратоксина

Показаны исходные мономеры (A и A') α-кобратоксина. I–III – обозначения петель, имеющих β–структурную конформацию. Две межмолекулярные дисульфидные связи образованы остатком *Cys* 3 и *Cys* 20 одного мономера с остатками *Cys* 20 и *Cys* 3 соседнего

А


A
Lymnaea stagnalis AChBP
Aplysia californica AChBP
specific [125I]-α-Bgtx binding, %
- lg [ws-lynx1], M
B
ws-lynx1, nAChR Torpedo
α-Bgtx, nAChR Torpedo
specific [125I]-α-Bgtx binding, %
- lg [compounds, M]
C
ws-lynx1, α7 nAChR
α-Bgtx, α7 nAChR
specific [125I]-α-Bgtx binding, %
- lg [compounds, M]
D
ws-lynx1, α4β2 nAChR
Epi, α4β2 nAChR
specific [3H]-Epi binding, %
- lg [compounds, M]

Б

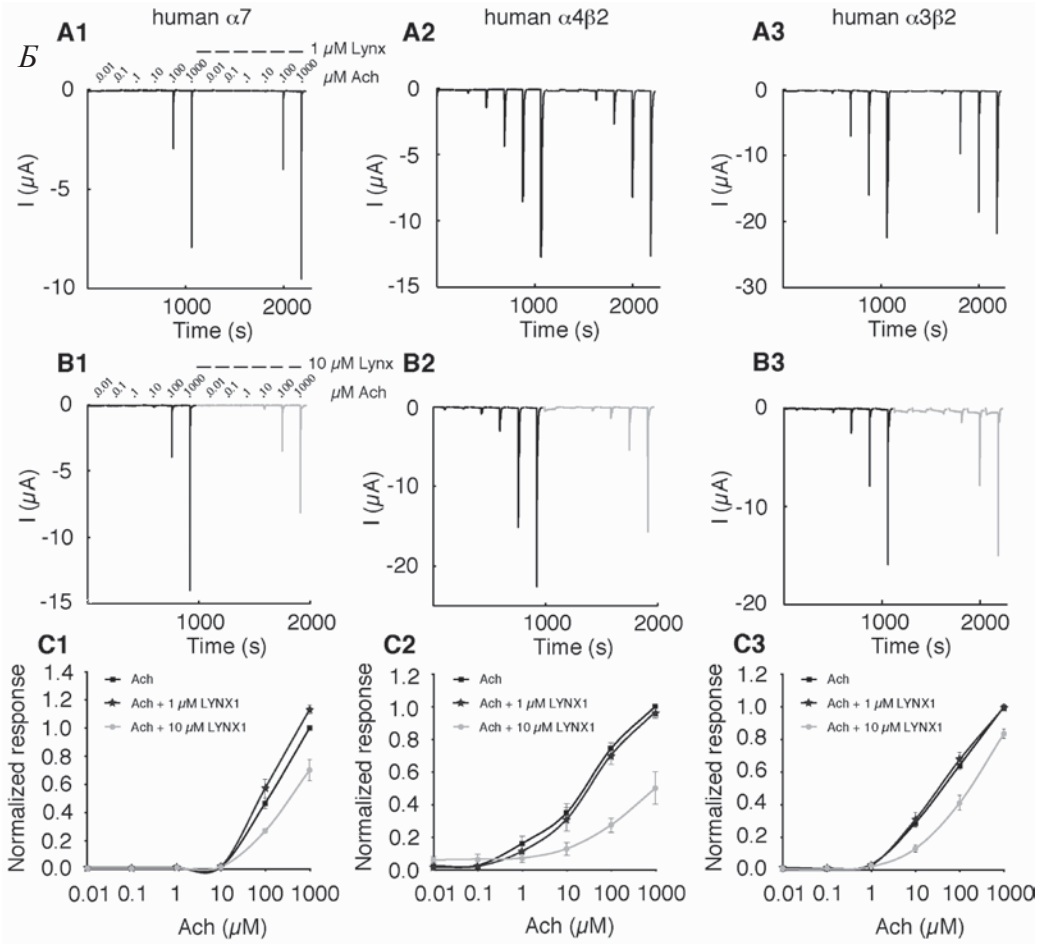

human α7
human α4β2
human α3β2
A1
A2
A3
1 μM Lynx
μM Ach
B1
B2
B3
10 μM Lynx
I (μA)
Time (s)
C1
C2
C3
Ach
Ach + 1 μM LYNX1
Ach + 10 μM LYNX1
Normalized response
Ach (μM)

Рис. 3. Взаимодействие ws-lynx1 с никотиновым ацетилхолиновым рецептором

А – конкуренция ws-lynx1 с иодированным α-бунгаротоксином за связывание с АХСБ и мембранно-связанным нАХР *Torpedo californica* и отсутствие конкуренции за связывание с α7 нАХР. *Б* – снижение амплитуды тока в α7 нАХР, гетерологически экмпрессированных в ооцитах *Xenopus*, при добавлении 10 μM ws-lynx1

зости от никотиновых рецепторов и модулирует их функциональную активность. До недавнего времени Lynx1 был недоступен в форме индивидуального белка. Поэтому все важнейшие исследования его функциональной активности, опубликованные в таких ведущих журналах, как Neuron и Science (см., например, Miwa et al., 2006; Morishita et al., 2010), были выполнены исключительно с использованием суперэкспрессии или нокаута гена Lynx1. Информации о том, каков механизм взаимодействия Lynx1 с нАХР, не имелось, а прогресс в этой области наметился, когда нам в 2011 г., благодаря экспрессии в *E. coli* и последующей очистке, удалось получить в виде индивидуального водорастворимого белка полноразмерный Lynx1, не имеющий GPI якоря (ws-lynx1) (Lyukmanova et al., 2011). В результате впервые были установлены концентрации, при которыхможно в опытах *in vitro* зарегистрировать эффекты ws-lynx1 на различные подтипы нАХР. При этом было впервые показано различие в характере связывания ws-lynx1 с двумя основными типами нАХР: ws-lynx1 конкурировал с радиоактивным α-бунгаротоксином за связывание с рецептором мышечного типа, но не конкурировал за связывание с нейрональным α7 нАХР (рис. 3а). Однако электрофизиологические опыты выявили ингибирование токов в α7 нАХР при добавлении 10 mM ws-lynx1 (рис. 3б).

5. Заключение

Эти результаты впервые показали, что ws-lynx1 может связываться с некоторыми подтипами нАХР по конкурентному механизму (в классическом центре связывания агонистов и антагонистов, хорошо охарактеризованном соответствующими кристаллическими структурами комплексов с АХБ), а также по неконкурентному – за пределами этого центра. В настоящее время, вводя мутации как в ws-lynx1, так и в индивидуальные подтипы нАХР, мы планируем получить информацию о соответствующих областях взаимодействия.

Таким образом, ведущиеся в настоящее время исследования открывают новые перспективы для использования высокоаффинных и селективных лигандов никотиновых рецепторов в качестве лекарственных препаратов.

Литература

Akaike A., Takada-Takatori Y., Kume T., Izumi Y. Mechanisms of neuroprotective effects of nicotine and acetylcholinesterase inhibitors: role of alpha4 and alpha7 receptors in neuroprotection // J. Mol. Neurosci. 2010. Vol. 40. P. 211-216.

Alkondon M., Rocha E.S., Maelicke A., Albuquerque E.X. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat brain. V. alpha-Bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in olfactory bulb neurons and presynaptic modulation of glutamate release //J. Pharmacol. Exp.Ther. 1996. Vol. 278. P. 1460-1471.

Azam L., Winzer-Serhan U.H., Chen Y., Leslie F.M. Expression of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit mRNAs within midbrain dopamine neurons // J. Comp. Neurol. 2002. Vol. 444. P. 260-274.

Changeux J.P. Nicotine addiction and nicotinic receptors: lessons from genetically modified mice // Nat. Rev. Neurosci. 2010. Vol. 11. P. 389-401.

Cohen J.B., Weber M., Huchet M., Changeux J.P. Purification from *Torpedo marmorata* electric tissue of membrane fragments particularly rich in cholinergic receptor protein // FEBS Lett. 1972. Vol. 26. P. 43-47.

Conti-Fine B.M., Navaneetham D., Lei S., Maus A.D. Neuronal nicotinic receptors in non-neuronal cells: new mediators of tobacco toxicity? // Eur. J. Pharmacol. 2000. Vol. 393. P. 279-294.

Court J., Martin-Ruiz C., Piggott M., Spurden D., Griffiths M., Perry E. Nicotinic receptor abnormalities in Alzheimer's disease // BHiol. Psychiatry. 2001. Vol. 49. P. 175-84.

D'Andrea M.R., Lee D.H., Wang H.Y., Nagele R.G. Targeting intracellular Aβ42 for Alzheimer's disease drug discovery // Drug Development Res. 2002. Vol. 56. P. 194-200.

Dineley K.T. Beta-amyloid peptide – nicotinic acetylcholine receptor interaction: the two faces of health and disease // Front Biosci. 2007. Vol. 12. P. 5030-5038.

Dineley K.T., Westerman M., Bui D. et al. β-Amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal α7 nicotinic acetylcholine receptors: in vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease // J. Neurosci. 2001. Vol. 21, P. 4125-4133.

Eldefrawi M.E., Eldefrawi A.T. Purification and molecular properties of the acetylcholine receptor from *Torpedo* electroplax // Arch. Biochem. Biophys. 1973. Vol. 159. P. 362-373.

Gotti C., *Clementi F.* Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology // Prog. Neurobiol. 2004. Vol. 74. P. 363-396.

Grady S.R., Salminen O., J. McIntosh M., Marks M.J., Collins A.C. Mouse striatal dopamine nerve terminals express α4α5β2 and two stoichiometric forms of α4β2*-nicotinic acetylcholine receptors // J. Mol. Neurosci. 2010. Vol. 40. P. 91-95.

Han T.S., Teichert R.W., Olivera B.M., Bulaj G. Conus venoms – a rich source of peptide-based therapeutics // Curr. Pharm. Des. 2008. Vol. 14. P. 2462-2479.

Henderson B.J., Carper D.J., González-Cestari T.F. et al. Structure-activity relationship studies of sulfonylpiperazine analogues as novel negative allosteric modulators of human neuronal nicotinic receptors // J. Med. Chem. Dec. 2011. Vol. 54. P. 8681-92.

Hernandez C.M., Dineley K.T. α7 nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease: neuroprotective, neurotrophic or both? // Curr. Drug. Targets. 2012. Vol. 13. P. 613-622.

Hone A.J., Whiteaker P., Mohn J.L., Jacob M.H., McIntosh J.M. Alexa Fluor 546-ArIB[V11L;V16A] is a potent ligand for selectively labeling alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors // J. Neurochem. 2010. Vol. 114. P. 994-1006.

Hucho F., Weise C. Ligand-Gated Ion Channels // Angew. Chem. Int. Ed. 2001. Vol. 40. P. 3100-3116.

Janson A.M., Fuxe K., Goldstein M. Differential effects of acute and chronic nicotine treatment on MPTP-(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) induced degeneration of nigrostriatal dopamine neurons in the black mouse // Clin. Investig. 1992. Vol. 70. P. 232-238.

Kasheverov I.E., Zhmak M.N., Khruschov A.Y., Tsetlin V.I. Design of new α-conotoxins: from computer modeling to synthesis of potent cholinergic compounds // Mar. Drugs. 2011. Vol. 9. P. 1698-1714.

Klink R., de Kerchove d'Exaerde A., Zoli M., Changeux J.P. Molecular and physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors in the midbrain dopaminergic nuclei // J. Neurosci. 2001. Vol. 21. P. 1452-63.

Kukhtina V., Kottwitz D., Strauss H., Heise B., Chebotareva N., Tsetlin V., Hucho F. Intracellular domain of nicotinic acetylcholine receptor: the importance of being unfolded // J. Neurochem. 2006. Vol. 97. Suppl. 1. P. 63-67.

*Kumar P., Meizel S. N*icotinic acetylcholine receptor subunits and associated proteins in human sperm // J. Biol. Chem. 2005. Vol. 280. P. 25928-25935.

Lindrstom J. Nicotinic acetylcholine receptors of muscles and nerves. Comparison of their structures, functional roles, and vulnerability to pathology // Ann. NY Acad. Sci. 2003. Vol. 993. P. 41-52.

Lyukmanova E.N., Shenkarev M.A., Mineev S.N. et al. NMR structure and action on nicotinic acetylcholine receptors of water-soluble domain of human Lynx 1 // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286. P. 10618-10627.

MacDermott A.B., Role L.W., Siegelbaum S.A. Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release // Annu. Rev. Neurosci. 1999. Vol. 22. P. 443-485.

Miwa J.M., Ibanez-Tallon I., Crabtree G.W. et al. lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS // Neuron. 1999. Vol. 23. P. 105-114.

Miwa J.M., Stevens T.R., King S.L. et al. The prototoxin lynx1 acts on nicotinic acetylcholine receptors to balance neuronal activity and survival *in vivo* // Neuron. 2006. Vol. 51. P. 587-600.

Morishita H., Miwa J.M., Heintz N., Hensch T.K. Lynx1, a cholinergic brake, limits plasticity in adult visual cortex // Science. 2010. Vol. 330. P. 1238-1240.

Muñoz P., Huenchuguala S., Paris I., Cuevas C. et al. Protective effects of nicotine against aminochrome-induced toxicity in substantia nigra derived cells: implications for Parkinson's disease // Neurotox Res. 2012. Vol. 22. P. 177-80.

Osipov A.V., Kasheverov I.E., Makarova Y.V. et al. Naturally occurring disulfide-bound dimers of three-fingered toxins: a paradigm for biological activity diversification // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283. P. 4571-4580.

Osipov A.V., Rucktooa P., Kasheverov I.E. et al. Dimeric α-cobratoxin X-ray structure: localization of intermolecular disulfides and possible mode of binding to nicotinic acetylcholine receptors // J. Biol. Chem. 2012. Vol. 287. P. 6725-6734.

Oz M., Lorke D.E., Yang K.H., Petroianu G. On the interaction of β-amyloid peptides and α7-nicotinic acetylcholine receptors in Alzheimer's disease // Curr. Alzheimer Res. 2013. Vol. 10. P. 618-30.

Quik M. Smoking, nicotine and Parkinson's disease // Trends Neurosci. 2004. Vol. 27. P. 561-568.

Quik M., Burdia T., O'Leary K. Nicotinic receptors as CNS targets for Parkinson's disease // Biochem. Pharmacol. 2007. Vol. 74. P. 1224-1234.

Parri H.R., Hernandez C.M., Dineley K.T. Research update: Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor mechanisms in Alzheimer's disease // Biochem. Pharmacol. Review. 2011. Vol. 82. P. 931-942.

Radcliffe P.M., Sterling C.R., Tank A.W. Induction of tyrosine hydroxylase mRNA by nicotine in rat midbrain is inhibited by mifepristone // J. Neurochem. 2009. Vol. 109. P. 1272-1284.

Reitz A.B., Demeter D.A., Lee D.H.S. et al. Method for treating neurodegenerative disoders. 2006. US Patent N 7 018 79.

Ripoll N., Bronnec M., Bourin M. Nicotinic receptors and schizophrenia // Curr. Med. Res. Opin. 2004. Vol. 20. P. 1057-1074.

Salvaterra P.M., Mahler H.R. Nicotinic acetylcholine receptor from rat brain. Solubilization, partial purification, and characterization // J. Biol. Chem. 1976. Vol. 251. P. 6327-6334.

Sciamanna M.A., Griesmann G.E., Williams C.L., Lennon V.A. Nicotinic acetylcholine receptors of muscle and neuronal (alpha7) types coexpressed in a small cell lung carcinoma // J. Neurochem. 1997. Vol. 69. № 6. P. 2302-2311.

Serova L., Sabban E.L. Involvement of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptors in gene expression of dopamine biosynthetic enzymes in rat brain // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2002. Vol. 303. № 3. P. 896-903.

Smit A.B., Syed N.I., Schaap D. et al. A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission // Nature. 2001. Vol. 411. P. 261-268.

Steinlein O.K. Nicotinic receptor mutations in human epilepsy // Prog. Brain Res. 2004. Vol. 145. P. 275-285.

Suzuki S., Kawamata J., Matsushita T. et al. 3-[(2,4-Dimethoxy)benzylidene]-anabaseine dihydrochloride protects against 6-hydroxydopamine-induced parkinsonian neurodegeneration through α7 nicotinic acetylcholine receptor stimulation in rats // J. Neurosci. Res. 2013. Vol. 91. P. 462-471.

Taly A., Corringer P.J., Guedin D., Lestage P., Changeux J.P. Nicotinic receptors: allosteric transitions and therapeutic targets in the nervous system // Nat. Rev. Drug Discov. 2009. Vol. 8. P. 733-750.

Terlau H., Olivera B.M. Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides // Physiol. Rev. 2004. Vol. 84. P. 41-68.

Thacker E.L., O'Reilly E.J., Weisskopf M.G. et al. Temporal relationship between cigarette smoking and risk of Parkinson disease // Neurology. 2007. Vol. 68. P. 764-768.

Timofeeva O.A., Levin E.D. Glutamate and nicotinic receptor interactions in working memory: importance for the cognitive impairment of schizophrenia // Neuroscience. 2011. Vol. 195. P. 21-36.

Tsetlin V.I. Snake venom alpha-neurotoxins and other three-finger proteins // Eur. J. Biochem. 1999. Vol. 264. P. 281-286.

Tsetlin V., Hucho F. Nicotinic acetylcholine receptors at atomic resolution // Curr. Opin. Pharmacol. 2009. Vol. 9. P. 306-310.

Tsetlin V., Utkin Y., Kasheverov I. Polypeptide and peptide toxins, magnifying lenses for binding sites in nicotinic acetylcholine receptors // Biochem. Pharmacol. 2009. Vol. 78. P. 720-731.

Turner J.R., Castellano L.M., Blendy J.A. Nicotinic partial agonists varenicline and sazetidine-A have differential effects on affective behavior. //J. Pharmacol. Exp. Ther. 2010. Vol. 334. P. 665-72.

Unwin N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution // J. Mol. Biol. 2005. Vol. 346. № 4. P. 967-989.

Vincent A., Beeson D., Lang B. Molecular targets for autoimmune and genetic disorders of neuromuscular transmission // Eur. J. Biochem. 2000. Vol. 267. № 23. P. 6717-6728.

Wang H.Y., Lee D.H., D'Andrea M.R., Peterson P.A., Shank R.P., Reitz A.B. beta-Amyloid (1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology // J. Biol. Chem. 2000. Vol. 275. P. 5626-5632.

Weltzin M.M., Schulte M.K. Pharmacological characterization of the allosteric modulator desformylflustrabromine and its interaction with alpha4beta2 neuronal nicotinic acetylcholine receptor orthosteric ligands // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2010. Vol. 334. P. 917-926.

Экспериментальные модели гиперпролактинемии

Т.С. Пронина, Л.К. Дильмухаметова, М.В. Угрюмов

Содержание

1. Введение
2. Моделирование гиперпролактинемии
   2.1. Дефицит катехоламинов – компенсируемая и хроническая гиперпролактинемии
   2.2. Галоперидол – моделирование гиперпролактинемии без пролактиномы
   2.3. Эстроген как фактор развития пролактиномы
   2.4. Генетические модели гиперпролактинемии и пролактином
3. Заключение

1. Введение

Пролактин (ПРЛ) – гипофизарный гормон, синтезирующийся в передней доле гипофиза (Freeman et al., 2000). Основной формой ПРЛ, продуцируемого лактотрофами гипофиза, является белок с молекулярной массой 23 кДа. Однако существуют другие формы гормона: в результате альтернативного сплайсинга образуется изоформа ПРЛ, состоящая из 137 аминокислотных остатков (Emanuele et al., 1992), а при протеолитическом расщеплении образуется ПРЛ с молекулярной массой 14, 16 и 22 кДа (Clapp et al., 1994; Torner et al., 1995). ПРЛ синтезируется в клетках передней доли гипофиза – в лактотрофах, которые занимают от 20 до 50% ее клеточной популяции в зависимости от пола и физиологического состояния организма.

Секреция ПРЛ в гипофизе находится под контролем различных физиологически активных веществ – ингибиторов и стимуляторов (Freeman et al., 2000). Основным регулятором, оказывающим ингибирующее влияние на секрецию ПРЛ, является дофамин (ДА), синтезирующийся нейронами туберо-инфундибулярной системы гипоталамуса (Ben-Jonathan, Hnasko, 2001). Эта регуляция опосредована через $Д_2$-рецепторы на лактотрофах (Ben-Jonathan, Hnasko, 2001). Кроме того, ДА оказывает ингибирующее влияние на пролиферацию лактотрофов (Lewinski et al., 1984), причем хроническая недостаточность этого влияния приводит к развитию гиперплазии гипофиза (Asa et al., 1999). Помимо ДА в регуляции секреции ПРЛ принимает участие и норадреналин (НА), синтезирующийся в норадренергических (НА-ергических) нейронах мозга. В отличие от ДА, НА, помимо прямого влияния на лактотрофы через адренорецепторы, оказывает непрямое стимулирующее влияние на выделение ПРЛ опосредованно через нейроны аркуатного ядра (Colthorpe et al., 2000; Johnston et al., 1985). Наряду с ДА в ингибиторном контроле секреции

Сокращения: ПРЛ – пролактин, ГАМК – γ-аминомасляная кислота, ГДА – гидроксидофамин, ДМИ – десмитилимипрамин.

ПРЛ участвуют γ-аминомасляная кислота (ГАМК), ацетилхолин, соматостатин и бомбезин (McCann et al., 1984; Flores et al., 1992). Стимулирующее действие на секрецию ПРЛ оказывают вазоактивный интестинальный полипептид, серотонин, тиреотропин-рилизинг-гормон, окситоцин, вазопрессин, гистамин, кальцитонин и в меньшей степени влияют следующие нейропептиды: субстанция Р, галанин, холицистокинин, нейротензин, ангиотензин II, эндотелины).

При нарушении ингибиторного контроля уровень ПРЛ в крови увеличивается, что приводит к развитию у человека синдрома гиперпролактинемии (Ben-Jonathan, Hnasko, 2001). Это заболевание, которым нередко страдают молодые социально активные люди в репродуктивном возрасте (Serri et al., 2003). Так, в возрасте 25–40 лет примерно 0,4% населения страдает гиперпролактинемией, что сопровождается возникновением опухолей гипофиза – пролактином, и приводит к нарушению репродуктивной функции и к бесплодию. Уровень ПРЛ в крови выше лабораторной нормы, или «биохимическая гиперпролактинемия», отмечается почти у 10% женщин, и этот показатель выше среди пациентов со специфическими симптомами. Гипрепролактинемия встречается у 9% женщин при аменорее, 25% женщин при галакторее и 70% женщин при галакторее и аменорее, а также у 5% мужчин при импотенции или бесплодии (Serri et al., 2003). В 30% случаев гиперпролактинемия является идиопатической, т.е. не связанной с другими заболеваниями или приемом медикаментов, причем в основе ее патогенеза, по всей вероятности, лежит дегенерация ДА-ергических нейронов тубероинфундибулярной системы гипоталамуса (Дедов и др., 2004; Chahal, Schlechte, 2008). Синдром гиперпролактинемии может также развиваться вследствие медикаментозного подавления ДА-ергической системы гипоталамуса как побочный эффект лечения основного заболевания. Кроме того, встречаются формы гиперпролактинемии, связанные с нарушением функционирования рецепторов к ДА на лактотрофах. Эти формы устойчивы к действию агонистов рецепторов к ДА, например бромокриптину (Chahal, Schlechte, 2008; Serri et al., 2003). Гиперпролактинемия также сопровождает такие заболевания, как гипотиреоидизм, почечные заболевания, поликистоз яичников, гипофизарные опухоли.

Данный обзор посвящен моделям гиперпролактинемии, обусловленной нарушением гипоталамического ДА-го звена регуляции секреции пролактина.

2. Моделирование гиперпролактинемии

2.1. Дефицит катехоламинов – компенсируемая и хроническая гиперпролактинемии

Фармакологически вызванная компенсируемая гиперпролактинемия

Гиперпролактинемию, обусловленную нарушением гипоталамического звена регуляции секреции ПРЛ, а именно дегенерацией ДА-ергических нейронов аркуатного ядра, чаще всего моделируют на крысах фармакологически с помощью 6-гидроксидофамина (6-ГДА) – специфического нейротоксина катехоламинергических

нейронов. 6-ГДА похож по структуре на ДА и НА, что обусловливает его специфический захват из внеклеточной среды в ДА-ергические и НА-ергические нейроны с помощью мембранного переносчика (Biegon, Rainbow, 1983; Blandini et al., 2008; Jonsson, 1983). В процессе действия 6-ГДА сначала подавляет синтез катехоламинов, а затем вызывает дегенерацию нейронов (Bartholini et al., 1970). Внутриклеточно токсин способствует разобщению окислительного фосфорилирования, что приводит к гибели нейронов. Традиционно 6-ГДА вводят стереотаксически в латеральные желудочки мозга (Ershov et al., 2005; Fenske, Wuttke, 1976; Зиязетдинова и др., 2008). 6-ГДА в процессе переноса с ликвором из боковых желудочков сначала в 3-й, а затем в 4-й желудочки диффундирует в близлежащие отделы мозга – последовательно в стриатум, медиобазальный гипоталамус и в черную субстанцию (Bosler, Calas, 1982). Кроме того, встречаются модели системного введения этого нейротоксина (Sheward et al., 1985). При этом 6-ГДА, который не проходит через гематоэнцефалический барьер (Blandini et al., 2008), оказывает токсическое действие на периферии и в циркумвентрикулярных областях мозга, в которых отсутствует гематоэнцефалический барьер, и одной из таких областей является срединное возвышение и вентарльная область аркуатного ядра (Sheward et al., 1985).

При стереотаксическом введении под наркозом в латеральный желудочек мозга животного по координатам вводят канюлю для инъекции 6-ГДА в растворе или раствора для контроля (Ershov et al., 2005; Зиязетдинова и др., 2008). Особенностью этой модели является то, что первая волна дегенерации ДА-ергических нейронов сменяется компенсаторным увеличением ДА в аркуатном ядре гипоталамуса и восстановлением уровня ПРЛ в крови (Fenske, Wuttke, 1976; Зиязетдинова и др., 2008) (табл. 1). По данным М. Фенске и В. Вуттке (Fenske, Wuttke, 1976), концентрация ПРЛ в крови увеличивается уже через час после введения 6-ГДА, достигает максимума на 2-ой день, сохраняется повышенной до 15-го дня и восстанавливается после 37-го дня. В наших экспериментах на 14-й и 45-й дни после стереотаксических инъекций также наблюдается вначале повышение, а затем восстановление уровня ПРЛ в крови у крыс, что свидетельствует о компенсации гиперпролактинемии (см. табл. 1) (Зиязетдинова и др., 2008). В гипофизе также наблюдаются изменения после введения 6-ГДА: на 14-й и 45-й дни вес гипофиза снижается на 20% по сравнению с контролем, а содержание ПРЛ снижается на 30–35%. Содержание мРНК $Д_2$-рецепторов в этом же эксперименте уменьшается на 30% на 14-й день и восстанавливается к 45-му дню (см. табл. 1) (Дильмухаметова и др., 2010). При этом в опыте митотическая активность уменьшается через 48 часов и увеличивается через 96 и 144 часа по сравнению с контролем, причем в самом контроле наблюдается постепенное снижение митотической активности в течение 48–144 часов для всех клеток переднего гипофиза (Lewinski et al., 1984).

Выявленные изменения в уровне ПРЛ в крови у крыс на 14-й и 45-й дни после введения 6-ГДА хорошо коррелируют с изменениями уровня ДА в гипоталамусе. Так, по данным В.Дж. Шеварда с соавторами (Sheward et al., 1985), концентрация ДА и НА в срединном возвышении и стебле гипофиза на 3-й день после введения токсина снижается на 50%. По нашим данным, в аркуатном ядре после введения 6-ГДА на 14-й день содержание ДА снижается на 55%, а содержание НА – на 80%.

Таблица 1

Изменение уровня пролактина (ПРЛ), мРНК $Д_2$-рецепторов, дофамина (ДА), норадреналина (НА) и L-диоксифенилаланина (L-ДОФА) после введения 6-ГДА на 14-й и 45-й дни по сравнению с контролем и на 45-й день после введения 6-ГДА по сравнению с 14-м днем после введения 6-ГДА (Дильмухаметова и др., 2009, 2010)

Параметры	Исследованная область	14 день 6-ГДА vs контроль	45 день 6-ГДА vs контроль	6-ГДА 45 день vs 14 день
ПРЛ	кровь	↑	→	↓
	гипофиз	↓	↓	→
мРНК $Д_2$ рецепторов	гипофиз	↓	→	↑
ДА	аркуатное ядро	↓	→	↑
НА		↓	↓	↑
L-ДОФА		↓	→	↑

На 45-й день уровень ДА в аркуатном ядре восстанавливается до контрольного уровня, а уровень НА по-прежнему снижен на 70% (см. табл. 1) (Дильмухаметова и др., 2009; Зиязетдинова и др., 2008). Восстановление уровня ДА может быть связано с его кооперативным синтезом моноферментными недофаминергическими нейронами (Ugrumov, 2008; Ugrumov et al., 2002, 2004, 2014) и/или с усилением его синтеза в сохранившихся ДА-ергических нейронах.

Для оценки секреторной активности (синтез и выделение ДА) нейронов аркуатного ядра применяли метод проточной инкубации слайсов ткани на 14-й и 45-й дни после введения нейротоксина и в контроле (Дильмухаметова и др., 2012, 2014). В норме стимулированное выделение ДА нейронами аркуатного ядра в 3 раза выше, чем спонтанное. На 14-й день после введения 6-ГДА было показано, что уровень спонтанного выделения ДА усиливался, а стимулированное выделение ДА отсутствовало, причем в ткани в опыте уровень ДА был значительно ниже, чем в контроле (табл. 2) (Дильмухаметова и др., 2012). На 45-й день наблюдалось значительное снижение спонтанного и стимулированного выделения ДА по сравнению с контролем, но при этом ДА-ергическая система восстановила способность выделять ДА в ответ на калиевую стимуляцию (см. табл. 2) (Дильмухаметова и др., 2014). Таким образом, на 45-й день наблюдается восстановление функциональной активности ДА-продуцирующих нейронов. Однако уровень ДА в ткани после инкубации на 45-й день после введения только 6-ГДА был выше, чем в контроле (см. табл. 2). При этом на 14-й день после введения 6-ГДА наблюдалось спонтанное выделение НА без стимулированного усиления его выделения, и уровень НА в ткани был значительно снижен (см. табл. 2) (Дильмухаметова и др., 2012). Интересно отметить, что на 45-й день после введения 6-ГДА НА-ергические нейроны уже отвечают на калиевую стимуляцию (см. табл. 2) (Дильмухаметова и др., 2014).

Помимо ДА была изучена секреция L-ДОФА как конечного продукта синтеза в моноферментных нейронах, содержащих тирозингидроксилазу, и промежуточного продукта синтеза ДА в ДА-ергических нейронах. В норме в аркуатном ядре

Таблица 2

Изменение уровня дофамина (ДА), норадреналина (НА) и L-диоксифенилаланина (L-ДОФА) после введения 6-ГДА на 14-й и 45-й дни по сравнению с контролем и на 45-й день после введения 6-ГДА по сравнению с 14-м днем после введения 6-ГДА

Параметры	ФАВ	14 день 6-ГДА vs контроль	45 день 6-ГДА vs контроль	6-ГДА 45 день vs 14 день
Спонтанное выделение	ДА	↓	↓	↓
	НА	↓	↓	→
	L-ДОФА	↑	↓	↓
Стимулированное выделение	ДА	↓	↓	→
	НА	↓	↓	→
	L-ДОФА	↑	→	↓
В ткани после инкубации	ДА	↓	→	↑
	НА	↓	↓	→
	L-ДОФА	→	↓	↓
Суммарно в ткани и среде	ДА	↓	↑	↑
	НА	↓	↓	→
	L-ДОФА	↑	↓	↓

L-ДОФА выделяется только спонтанно (Дильмухаметова и др., 2012). При этом на 45-й день после введения только 6-ГДА спонтанное выделение L-ДОФА ниже, чем в контроле, а после добавления калия в среду становиться равным контролю, демонстрируя небольшое симулированное усиление выделения (см. табл. 2) (Дильмухаметова и др., 2014). Это также сложно объяснить, так как L-ДОФА, как и ДА, синтезируются в цитоплазме, но при этом ДА после синтеза накапливается в везикулах, в то время как общепринято, что L-ДОФА содержится в цитозоле, а не в секреторных гранулах.

Биохимические изменения уровня ДА и НА в аркуатном ядре тесно связаны с морфологическими изменениями в гипоталамусе после введения нейротоксина. Так, уже через 7 дней после введения 6-ГДА в аркуатном ядре наблюдается значительное снижение числа ДА-ергических нейронов, содержащих оба фермента синтеза ДА – тирозингидроксилазу и декарбоксилазу ароматических аминокислот, и увеличение числа недофаминергических моноферментных нейронов, содержащих по одному из ферментов синтеза ДА (Ershov et al., 2005). При введения только 6-ГДА на 14-й день наблюдалось значительное уменьшение числа НА-ергических аксонов (Дильмухаметова и др., 2012), а на 45-й день после введения только 6-ГДА в аркуатном ядре оставалось всего 35% терминалей НА-ергических аксонов (Дильмухаметова и др., 2014) (табл. 3). При этом на 14-й день после введения 6-ГДА

Таблица 3

Изменение числа тирозингидроксилаза-иммунопозитивных (ТГ) нейронов и норадренергических (НА) терминалей аксонов, а также оптической плотности тирозингидроксилаза-иммунопозитивных нейронов в аркуатном ядре (АЯ) и в отдельных его областях – дорсомедиальной (ДМ) и вентролатеральной (ВЛ), после введения 6-ГДА на 14-й и 45-й дни по сравнению с контролем, а также на 45-й день после введения 6-ГДА по сравнению с 14-м днем после введения 6-ГДА

Параметры	Исследованная область	14 день 6-ГДА vs контроль	45 день 6-ГДА vs контроль	6-ГДА 45 день vs 14 день
ТГ нейроны	ДМ	↓	↓	→
	ВЛ	↑	→	↓
	АЯ	↓	↓	↓
НА терминали	ДМ	↓	↓	→
	ВЛ	↓	↓	→
	АЯ	↓	↓	→
Оптическая плотность ТГ нейронов	ДМ	→	→	↑
	ВЛ	↑	↑	↑

наблюдалось снижение числа тирозингидроксилаза-иммунопозитивных нейронов в дорсомедиальной области аркуатного ядра, где локализованы в основном биферментные ДА-ергические нейроны, что объясняет значительное снижение синтеза ДА как на 14-й, так и на 45-й день (Дильмухаметова и др., 2012, 2014) (см. табл. 3). Однако в дорсомедиальной области оптическая плотность нейронов, коррелирующая с внутриклеточным содержанием тирозингидроксилазы, увеличивается при сохранении НА-ергического контроля (см. табл. 3). Это может свидетельствовать о протекторном влиянии НА на ДА-ергические биферментные нейроны, которые локализованы в этой области аркуатного ядра (Ershov et al., 2002a,b), что согласуется с данными о том, что НА способен снижать оксидативный стресс на культуре мезенцефальных ДА-ергических нейронов (Troadec et al., 2001). При этом на 45-й день после введения 6-ГДА при нарушении НА-ергической иннервации аркуатного ядра в вентролатеральной области аркуатного ядра, где содержатся преимущественно неДА-ергические нейроны, экспрессирующие только тирозингидроксилазу (Ershov et al., 2002a,b; Okamura et al., 1988) и участвующие в кооперативном синтезе ДА (Ugrumov et al., 2004), отмечено увеличение числа тирозингидроксилаза-иммунопозитивных нейронов и содержания самой тирозингидроксилазы в этих нейронах по сравнению с нормой (Дильмухаметова и др., 2012, 2014) (см. табл. 3).

Таким образом, при фармакологическом выключении ДА-ергических нейронов и НА-ергических аксонов аркуатного ядра у крыс развивается компенсируемая гиперпролактинемия. При этом первоначальный дефицит ДА компенсируется за счет синтеза ДА неДА-ергическими нейронами аркуатного ядра (Fenske, Wuttke, 1976; Дильмухаметова и др., 2009, 2010; Зиязетдинова и др., 2008).

Фармакологически вызванная хроническая гиперпролактинемия

Помимо наиболее широко используемой модели дегенерации катехоламинергических нейронов была разработана модель избирательной дегенерации только ДА-ергических нейронов при сохранении НА-ергических аксонов в аркуатном ядре у крыс. Это делает возможным оценить вклад в развитие гиперопролактинемии каждой из катехоламинергических компонент – ДА-ергической и НА-ергической. Дегенерация только ДА-ергических нейронов тубероинфундибулярной системы моделируется путем внутрижелудочкового введения 6-ГДА после предварительного системного введения десметилимипрамина (ДМИ) – протектора НА-ергических нейронов. ДМИ связывается с мембранным переносчиком НА на НА-ергических нейронах и таким образом ингибирует обратный захват НА, предотвращая захват 6-ГДА и дегенерацию нейронов (Biegon, Rainbow, 1983; Fulceri et al., 2006; Sheward et al., 1985). В отличие от предыдущей модели с введением только 6-ГДА, на этой модели не происходит компенсаторного восстановления уровня ПРЛ в крови (табл. 4) (Дильмухаметова и др., 2009). В результате концентрация ПРЛ в крови сохраняется в 2 раза повышенной как на 14-й, так и на 45-й день после введения 6-ГДА с ДМИ (табл. 4) (Дильмухаметова и др., 2009). В гипофизе наблюдаются отчасти схожие с предыдущей моделью изменения: содержание ПРЛ снижено на 14-й день на 65%, а на 45-й день на 30%, вес гипофиза до 45-го дня отстает на 20% от веса гипофиза контрольных особей, а содержание мРНК $Д_2$-рецепторов уменьшается на 30%, причем только на 45-й день (см. табл. 4) (Дильмухаметова и др., 2010). Кроме того, через 48 часов после введения 6-ГДА и ДМИ, так же как и на модели введения только 6-ГДА снижается, митотическая активность лактотрофов, а через 96 и 144 часа повышается (Lewinski et al., 1984).

На данной модели изменения в уровне ПРЛ в крови коррелируют также с изменениями уровня ДА в гипоталамусе. В срединном возвышении и стебле гипофиза

Таблица 4

Изменение уровня пролактина (ПРЛ), мРНК $Д_2$-рецепторов, дофамина (ДА), норадреналина (НА) и L-диоксифенилаланина (L-ДОФА) после введения ДМИ и 6-ГДА на 14-й и 45-й дни по сравнению с контролем и на 45-й день после введения ДМИ и 6-ГДА по сравнению с 14-м днем после введения ДМИ и 6-ГДА

Параметры	Исследованная область	14 день ДМИ+6-ГДА vs контроль	45 день ДМИ+6-ГДА vs контроль	ДМИ+6-ГДА 45 день vs 14 день
ПРЛ	кровь	↑	↑	→
	гипофиз	↓	↓	↑
мРНК $Д_2$-рецепторов	гипофиз	→	↓	→
ДА	АЯ	↓	↓	↓
НА		↓	→	↑
L-ДОФА		↑	↓	↓

на 3-й день после введения 6-ГДА с ДМИ наблюдается снижение ДА на 50% без изменений содержания НА (Sheward et al., 1985). В аркуатном ядре содержание ДА на 14-й день снижается на 75%, а на 45-й день – на 90%. При этом содержание НА незначительно (на 20%) снижается только на 14-й день и полностью восстанавливается к 45-му дню (см. табл. 4) (Дильмухаметова и др., 2009).

Для оценки секреторной активности нейронов аркуатного ядра также применяли метод проточной инкубации слайсов ткани на 14-й и 45-й дни после введения нейротоксина и в контроле (Дильмухаметова и др., 2012, 2014). При введения ДМИ с 6-ГДА на 14-й день НА выделялся спонтанно и стимулированно, но уровень выделявшегося НА был ниже, чем в контроле (см. табл. 5). При этом НА-ергические нейроны отвечают на калиевую-стимуляцию (см. табл. 5). Кроме того, суммарный уровень НА при введении ДМИ с 6-ГДА почти не отличается от контрольного (см. табл. 5). Эти результаты отчасти согласуются с данными других авторов, продемонстрировавших, что концентрация НА в срединном возвышении не изменялась через 24 часа после внутривенного введения ДМИ и 6-ГДА (Sheward et al., 1985). Таким образом, наблюдается незначительное снижение НА-ергической иннервации с последующим частичным восстановлением.

В норме стимулированное выделение ДА нейронами аркуатного ядра в 3 раза выше, чем спонтанное. На 14-й день при введении ДМИ и 6-ГДА, так же как и при введении только 6-ГДА, было показано, что уровень спонтанного выделения ДА

Таблица 5

Изменение уровня дофамина (ДА), норадреналина (НА) и L-диоксифенилаланина (L-ДОФА) после введения ДМИ и 6-ГДА на 14-й и 45-й дни по сравнению с контролем и на 45-й день после введения ДМИ и 6-ГДА по сравнению с 14-м днем после введения ДМИ и 6-ГДА

Параметры	ФАВ	14 день ДМИ+6-ГДА vs контроль	45 день ДМИ+6-ГДА vs контроль	ДМИ+6-ГДА 45 день vs 14 день
Спонтанное выделение	ДА	↑	↓	↓
	НА	↓	↓	↓
	L-ДОФА	↑	↓	↓
Стимулированное выделение	ДА	↓	↓	→
	НА	↓	↓	↑
	L-ДОФА	↑	↓	↓
В ткани после инкубации	ДА	↓	↓	→
	НА	↓	→	↑
	L-ДОФА	↑	↓	↓
Суммарно в ткани и среде	ДА	↓	↓	↓
	НА	↓	→	↑
	L-ДОФА	↑	↓	↓

усиливался, а стимулированное выделение ДА отсутствовало, и в ткани уровень ДА был значительно снижен по сравнению с контролем (см. табл. 5) (Дильмухаметова и др., 2012). Также наблюдалось значительное снижение спонтанного и стимулированного выделения ДА по сравнению с контролем, но при этом ДА-ергическая система восстановила способность выделять ДА в ответ на калиевую стимуляцию, по сравнению с тем, что наблюдалось на 14-й день после введения токсина (см. табл. 5). Таким образом, на 45-й день наблюдается восстановление функциональной активности ДА-продуцирующих нейронов. Однако уровень ДА в ткани после инкубации на 45-й день после введения только 6-ГДА был выше, а после введения ДМИ с 6-ГДА – значительно ниже, чем в контроле (Дильмухаметова и др., 2014). Это свидетельствует о том, что НА оказывает ингибирующее влияние на синтез ДА.

На 45-й день после введения ДМИ с 6-ГДА уровень спонтанного и стимулированного выделения L-ДОФА значительно ниже, чем в контроле (см. табл. 5) (Дильмухаметова и др., 2014). Кроме того, суммарное содержание L-ДОФА в ткани и среде после введения ДМИ с 6-ГДА меньше, чем после введения только 6-ГДА (Дильмухаметова и др., 2014). Это свидетельствует о том, что уровень синтеза L-ДОФА ниже при сохранении НА-ергической иннервации аркуатного ядра, чем при ее отсутствии.

Биохимические изменения уровня ДА и НА в аркуатном ядре при введении ДМИ и 6-ГДА коррелируют с морфологическими изменениями в гипоталамусе после ведения нейротоксина. На модели введения ДМИ и 6-ГДА, так же как и на модели введения только 6-ГДА, наблюдалось снижение числа тирозингидроксилаза-иммунопозитивных нейронов в дорсомедиальной области аркуатного ядра, где локализованы в основном биферментные ДА-ергические нейроны, что объясняет значительное снижение синтеза ДА на обеих моделях как на 14-й день, так и на 45-й день (табл. 6) (Дильмухаметова и др., 2012, 2014). Однако в дорсомедиальной области оптическая плотность нейронов, коррелирующая с внутриклеточным содержанием тирозингидроксилазы, и площадь самих нейронов увеличивается при сохранении НА-ергического контроля (см. табл. 6). Это подтверждает предположение о протекторном влиянии НА по отношению к ДА-ергическим биферментным нейронам, которые локализованы в этой части аркуатного ядра.

При сохранении НА-ергической иннервации после введения ДМИ с 6-ГДА число тирозингидроксилаза-иммунопозитивных нейронов и содержание тирозингидроксилазы в нейронах в вентролатеральной области не изменилось (Дильмухаметова и др., 2012, 2014) (см. табл. 6). Приведенные данные свидетельствуют о том, что НА ингибирует синтез тирозингидроксилазы в моноферментных нейронах вентролатеральной области аркуатного ядра. Это хорошо согласуется с данными Дайкоку с соавторами (Daikoku et al., 1986), показавшими, что хирургическая деафферентация медиобазального гипоталамуса приводит к увеличению числа тирозингидроксилаза-иммунопозитивных нейронов в вентролатеральной области аркуатного ядра. Прямое доказательство НА-ергического ингибиторного контроля экспрессии тирозингидроксилазы в неДА-ергических нейронах было недавно получено нами при изучении вазопрессинергических нейронов супраоптического ядра, эксперсирующих тирозингидроксилазу (Abramova et al., 2011).

Таблица 6

Изменение числа тирозингидроксилаза-иммунопозитивных (ТГ) нейронов и норадренергических (НА) терминалей аксоно, оптической плотности тирозингидроксилаза-иммунопозитивных нейронов в аркуатном ядре (АЯ) и в отдельных его областях – дорсомедиальной (ДМ) и вентролатеральной, после введения ДМИ и 6-ГДА на 14-й и 45-й дни по сравнению с контролем и на 45-й день после введения ДМИ и 6-ГДА по сравнению с 14-м днем после введения ДМИ и 6-ГДА

Параметры	Исследованная область	14 день ДМИ+6-ГДА vs контроль	45 день ДМИ+6-ГДА vs контроль	ДМИ+6-ГДА 45 день vs 14 день
ТГ нейроны	ДМ	↓	↓	→
	ВЛ	→	→	↓
	АЯ	↓	↓	↓
НА терминали	ДМ	↓	↓	→
	ВЛ	↓	↓	→
	АЯ	↓	↓	→
Оптическая плотность ТГ нейронов	ДМ	↓	↓	↓
	ВЛ	↓	→	↓

Из приведенных наших и литературных данных следует, что НА оказывает ингибирующее влияние на экспрессию тирозингидроксилазы в моноферментных нейронах вентролатеральной области аркуатного ядра и протекторное влияние на биферментные нейроны дорсомедиальной области аркуатного ядра.

Таким образом, при функциональной недостаточности ДА-ергических нейронов сохранение НА-ергической иннервации аркуатного ядра приводит к снижению экспрессии тирозингидроксилазы в неДА-ергических моноферментных нейронах аркуатного ядра и ингибированию синтеза ДА, что приводит к развитию хронической гиперпролактинемии.

2.2. Галоперидол – моделирование гиперпролактинемии без пролактиномы

Моделирование гипофизарной гиперпролактинемии путем фармакологического ингибирования рецепторов на лактотрофах основано на том, что ДА влияет на секрецию ПРЛ через $Д_2$-рецепторы на лактотрофах (Ben-Jonathan, Hnasko, 2001). В качестве ингибитора $Д_2$-рецепторов обычно используют галоперидол, который, хотя и действует на все типы ДА рецепторов, на $Д_2$-подобные рецепторы оказывает в 20 раз более сильное воздействие, чем на $Д_1$-подобные рецепторы (Missale et al., 1998). Галоперидол вводят ежедневно подкожно (Autelitano et al., 1989; Fekete et al., 1979) или имплантируют подкожно капсулы длительного выделения (Arbogas, Voogt, 1991; Mohankumar et al., 1997).

Через 1,5 часа после подкожного введения галоперидола секреция ДА в аркуатном ядре не меняется. Через 3 дня содержание мРНК тирозингидроксилазы также не меняется, однако концентрация L-ДОФА увеличивается в 1,5 раза (Arbogast, Voogt, 1991). Через 6 месяцев концентрация ДА в аркуатном ядре не меняется, а в срединном возвышении увеличивается в 2 раза, при этом через 9 месяцев и в аркуатном ядре, и в срединном возвышении концентрация ДА повышена в 1,5 раза (Mohankumar et al., 1997).

Концентрация ПРЛ в крови увеличивается уже через 15 минут после введения галоперидола (Machiavelli et al., 1982), через 6 повышена в 8 раз, а через 9 месяцев – в 20 раз (Mohankumar et al., 1997). При этом эффект галоперидола носит дозазависимый характер, так, при более высоких дозах галоперидола концентрация ПРЛ в крови увеличивается в 20 раз уже через 3 дня (Arbogast, Voogt, 1991).

В гипофизе через 15 минут после введения галоперидола наблюдается стимуляция синтеза ДНК (Machiavelli et al., 1982), однако через 6 месяцев вес гипофиза был на 12% меньше чем в контроле, а через 9 месяцев достиг контрольного уровня (Mohankumar et al., 1997). Концентрация ПРЛ в гипофизе через 15 минут достоверно снижается (Machiavelli et al., 1982), через 6 месяцев на 10% ниже, чем у контрольных особей, но статистически недостоверно (Mohankumar et al., 1997). Содержание мРНК $Д_2$ рецепторов также недостоверно снижена на 20% после 5 дней ежедневного введения галоперидола (Autelitano et al., 1989).

Таким образом, хроническая модель гиперпролактинемии, основанная на ингибировании рецепторов к ДА на лактотрофах, приводит к гиперпролактинемии, но без развития пролактиномы.

2.3. Эстроген как фактор развития пролактиномы

ДА играет роль основного ингибитора секреции ПРЛ, чье влияние маскирует действие других ингибиторов и стимуляторов секреции ПРЛ и пролиферации лактотрофов. При этом на фоне дефицита ДА проявляется влияние на секрецию ПРЛ или пролиферацию лактотрофов других физиологически активных веществ, таких как эстроген (Cristina et al., 2006; Hentges, Low, 2002). У мышей с нокаутом $Д_2$-рецепторов уровень эстрогенов у самок на 70%, а у самцов на 20% меньше, чем у нормальных мышей, и почти одинаков у обоих полов (8 и 9 нг/л) (Saiardi et al., 1997), при этом сохраняется бóльшая чувствительность лактотрофов самок к действию эстрогена (Hentges, Low, 2002). Моделирование синдрома гиперпролактинемии на животных с помошью 17-β-эстрадиола основано на том, что он оказывает ингибирующее влияние на активность ДА-синтезирующих нейронов тубероинфундибулярной системы (Бабичев, 2005; DeMaria et al., 2000). Действительно, высокие дозы 17-β-эстрадиола ингибируют экспрессию тирозингидроксилазы в нейронах аркуатного ядра (Morel et al., 2009). Механизм ингибирования заключается в следующем: при хроническом воздействии эстрадиола в аркуатном ядре активируются глиальные клетки и увеличивается продукция цитокининов, что приводит к появлению NO-связанных свободных радикалов, которые нитриру-

ют тирозингидроксилазу, инактивируя ее, соответственно, снижая синтез ДА (Yen et al., 1999; MohanKumar et al., 2010). В результате снижается и выделение ДА в портальный кровоток, развивается синдром гиперпролактинемии (Demarest et al., 1984; Arendash, Leung, 1986). Стойкая активация лактотрофов гипофиза сопровождается увеличением их пролиферации и в конечном счете развитием пролактиномы (Sarkar, Yen, 1985).

2.4. Генетические модели гиперпролактинемии и пролактином

Кроме фармакологической модели ингибирования $Д_2$-рецепторов существует генетическая модель функциональной недостаточности $Д_2$-рецепторов. Для этого используются мыши с нокаутом гена $Д_2$-рецепторов. При этом развитие гиперпролактинемии и пролактином происходит постепенно с возрастом (Asa et al., 1999; Hentges, Low, 2002).

Кроме того, при отсутсвии ДА-ергического ингибирования секреции ПРЛ и пролиферации лактотрофов, проявляется влияние других физиологически активных веществ, таких как эстроген (Cristina et al., 2006; Hentges, Low, 2002). Уровень эстрогенов у самок на 70%, а у самцов на 20% меньше, чем у нормальных мышей, и почти одинаков у обоих полов (8 и 9 нг/д) (Saiardi et al., 1997), при этом сохраняется бóльшая часть чувствительных лактотрофов самок к действию эстрогена (Hentgea, Low, 2002).

В результате концентрация ПРЛ в крови с 12-недельного возраста в 3 раза выше у нокаутных животных, чем у мышей исходных линий, и продолжает повышаться (Hentges, Low, 2002; Kelly et al., 1997). При этом у самок концентрация ПРЛ в 4 раза выше, чем у самцов, и к 18 месяцам становится в 30 раз выше, чем у овариэктомированных самок (Cristina et al., 2006; Hentges, Low, 2002). Изменения в гипофизе также накапливаются с возрастом. До 3 месяцев различий (статистически достоверных) в весе гипофиза у мышей обоего пола не наблюдается (Hentges, Low, 2002; Kelly et al., 1997). С возрастом вес гипофиза увеличивается, и различия усиливаются, причем у самок вес гипофиза увеличивается быстрее, чем у самцов, а овариектомия убирает эти различия (Asa et al., 1999; Hentges, Low, 2002; Saiardi et al., 1997). Содержание ПРЛ в гипофизе снижено на 50% (Saiardi et al., 1997), при этом увеличивается число лактотрофов и наблюдается уменьшение числа гонадотрофов (Kelly et al., 1997). С 16-месячного возраста у самок наблюдается развитие пролактином (Cristina et al., 2006).

Таким образом, это модель хронической прогрессирующей гиперпролактинемии и модель развития пролактином.

3. Заключение

Большинство используемых моделей гиперпролактинемии связано с предотварщением действия ДА на лактотрофы гипофиза, что моделируется на гипоталамическом или гипофизарном уровне с помощью антагонистов ДА или с помощью

нокаута гена рецепторов к ДА. Глубокое понимание причин и механизмов развития гиперпролактинемии, разработка ранней диагностики и лечения гиперпролактинемии возможны только при создании адекватных экспериментальных моделей и их тщательного анализа. В дальнейшем следует провести параллель между созданными моделями и различными проявлениями синдрома гиперпролактинемии у человека, что сопряжено с рядом сложностей. Так, у пациентов с синдромом гиперпролактинемии оценку метаболизма ДА в гипоталамусе можно дать только с помощью позитронно-эмиссионной томографии с использование лигандов к рецепторам ДА, что в нашей стране до сих пор не представляется возможным. Разрботка этого подхода позволит с большей определенностью оценить адекватность экспериментальных моделей этого социально значимого заболевания.

Литература

Бабичев В.Н. Половые гормоны и центральная нервная система // Росс. хим. журнал. 2005. № 1. С. 94-103.

Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Романцова Т.И. Синдром гиперпролактинемии. М.-Тверь: Триада, 2004. 304 с.

Дильмухаметова Л.К., Пронина Т.С., Зияземдинова Г.З. и др. Роль норадреналина в развитии дофамин-зависимой гиперпролактинемии. // Нейрохимия. 2009. Вып. 26. Р. 318-327.

Дильмухаметова Л.К., Пронина Т.С., Воробьева Н.Е. и др. Изменения функциональной активности лактотрофов при недостаточности дофаминергической системы гипоталамуса // Докл. РАН. 2010. Вып. 430. № 2. Р. 273-276.

Дильмухаметова Л.К., Пронина Т.С., Угрюмов М.В. Роль норадреналина в регуляции дофамин-продуцирующих нейронов аркуатного ядра у крыс // Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова. 2012. Вып. 38. № 12. Р. 1507-1519.

Дильмухаметова Л.К., Пронина Т.С., Угрюмов М.В. Регуляция компенсаторного синтеза дофамина в аркуатном ядре у крыс // Нейрохимия. 2014. Вып. 31. № 3. Р. 207.

Зияземдинова Г.З., Сапронова А.Я., Киясова В.Я. и др. Компенсаторная реакция при дегенерации дофаминергических нейронов аркуатного ядра // Журнал эволюцю биохим. Физиол. 2008. Вып. 44. Р. 72-77.

Abramova M.A., Calas A., Ugrumov M. Vasopressinergic neurons of the supraoptic nucleus in perinatal rats: reaction to osmotic stimulation and its regulation // Brain Structure & Function 2011. Vol. 215. № 3-4. P. 195-207.

Arbogast L.A., Voogt J.L. Hyperprolactinemia increases and hypoprolactinemia decreases tyrosine hydroxylase messenger ribonucleic acid levels in the arcuate nuclei, but not the substantia nigra or zona incerta // Endocrinology. 1991. Vol. 128. P. 997-1005.

Arendash G.W. Leung P.C. Alleviation of estrogen-induced hyperprolactinemia through intracerebral transplantation of hypothalamic tissue containing dopaminergic neurons // Neuroendocrinology. 1986. Vol. 43. № 3. P. 359-367.

Asa S.L., Kelly M.A., Grandy D.K., Low M.J. Pituitary lactotroph adenomas develop after prolonged lactotroph hyperplasia in dopamine D2 receptor-deficient mice // Endocrinology. 1999. Vol. 140. P. 5348-5355.

Autelitano D.J., Snyder L., Sealfon S.C., Roberts J.L. Dopamine D2-receptor messenger RNA is differentially regulated by dopaminergic agents in rat anterior and neurointermediate pituitary // Mol. Cell Endocrinol. 1989. Vol. 67. P. 101-105.

Bartholini G., Richards J.G., Pletscher A. Dissociation between biochemical and ultrastructural effects of 6-hydroxydopamine in rat brain // Experientia. 1970. Vol. 26. P. 142-144.

Ben-Jonathan N., Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor // Endocr. Rev. 2001. Vol. 22. P. 724-763.

Biegon A., Rainbow T.C. Localization and characterization of [3H]desmethylimipramine binding sites in rat brain by quantitative autoradiography // J. Neurosci. 1983. Vol. 3. P. 1069-1076.

Blandini F., Armentero M.T., Martignoni E. The 6-hydroxydopamine model: news from the past // Parkinsonism Relat. Disord. 2008. Vol. 14. Suppl. 2. P. S124-S129.

Bosler O., Calas A. Radioautographic investigation of monoaminergic neurons: an evaluation // Brain Res. Bull. 1982. Vol. 9. P. 151-169.

Chahal J., Schlechte J. Hyperprolactinemia // Pituitary. 2008. Vol. 11. P. 141-146.

Clapp C. Torner L. Gutierrez-Ospina G. et al. The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. Vol. 91. № 22. P. 10384-10388.

Colthorpe K.L., Nalliah J., Anderson S.T., Curlewis J.D. Adrenoceptor subtype involvement in suppression of prolactin secretion by noradrenaline // J. Neuroendocrinol. 2000. Vol. 12. P. 297-302.

Cristina C., Garcia-Tornadu I., Diaz-Torga G. et al. Dopaminergic D2 receptor knockout mouse: an animal model of prolactinoma // Front. Horm. Res. 2006. Vol. 35. P. 50-63.

Daikoku S., Kawano H., Okamura et al. Ontogenesis of immunoreactive tyrosine hydroxylase-containing neurons in rat hypothalamus // Dev. Brain Res. 1986. Vol. 393. № 1. P. 85-98.

Demarest K.T. Riegle G.D. Moore K.E. Long-term treatment with estradiol induces reversible alterations in tuberoinfundibular dopaminergic neurons: a decreased responsiveness to prolactin // Neuroendocrinology. 1984. Vol. 39. № 3. P. 193-200.

DeMaria J.E. Nagy G.M. Freeman M.E. Immunoneutralization of prolactin prevents stimulatory feedback of prolactin on hypothalamic neuroendocrine dopaminergic neurons // Endocrine. 2000. Vol. 12. № 3. P. 333-337.

Emanuele N.V., Jurgens J.K., Halloran M.M. et al. The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA // Mol. Endocrinol. 1992. Vol. 6. № 1. P. 35-42.

Ershov P.V., Ugrumov M.V., Calas A., Krieger M., Thibaul, J. Differentiation of tyrosine hydroxylase-synthesizing and/or aromatic L-amino acid decarboxylase-synthesizing neurons in the rat mediobasal hypothalamus: quantitative double-immunofluorescence study // J. Comp. Neurol. 2002a. Vol. 446. № 2. P. 114-122.

Ershov P.V., Ugrumov M.V., Calas A. et al. Neurons possessing enzymes of dopamine synthesis in the mediobasal hypothalamus of rats. Topographic relations and axonal projections to the median eminence in ontogenesis // J. Chem. Neuroanat. 2002b. Vol. 24. № 2. P. 95-107.

Ershov P.V., Ugrumov M.V., Calas A. et al. Degeneration of dopaminergic neurons triggers an expression of individual enzymes of dopamine synthesis in non-dopaminergic neurons of the arcuate nucleus in adult rats // J. Chem. Neuroanat. 2005. Vol. 30. P. 27-33.

Fekete M.I., Herman J.P., Kanyicska B., Palkovits M. Dopamine, noradrenaline and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) levels of individual brain nuclei, effects of haloperidol and pargyline // J. Neural. Transm. 1979. Vol. 45. P. 207-218.

Fenske M., Wuttke W. Effects of intraventricular 6-hydroxydopamine injections on serum prolactin and LH levels: absence of stress-induced pituitary prolactin release // Brain Res. 1976. Vol. 104. P. 63-70.

Flores C.M. Hulihan-Giblin B.A. Hornby P.J. Lumpkin M.D. Kellar K.J. Partial characterization of a neurotransmitter pathway regulating the in vivo release of prolactin // Neuroendocrinology. 1992. Vol. 55. № 5. P. 519-528.

Freeman M.E., Kanyicska B., Lerant A., Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion // Physiol. Rev. 2000. Vol. 80. P. 1523-1631.

Fulceri F., Biagioni F., Lenzi P. et al. Nigrostriatal damage with 6-OHDA: validation of routinely applied procedures // Ann. NY Acad. Sci. 2006. Vol. 1074. P. 344-348.

Hentges S.T., Low M.J. Ovarian dependence for pituitary tumorigenesis in D2 dopamine receptor-deficient mice // Endocrinology. 2002. Vol. 143. P. 4536-4543.

Johnston C.A., Spinedi E.J., Negro-Vilar A. Effect of acute ether stress on monoamine metabolism in median eminence and discrete hypothalamic nuclei of the rat brain and on anterior pituitary hormone secretion // Neuroendocrinology. 1985. Vol. 41. P. 83-88.

Jonsson G. Chemical lessions techniques: monoamine neurotoxins // Handbook of chemical neuroanatomy: Methods in chemical neuroanatomy. Eds. A. Biörklund, T. Hökfelt. Elsevier, 1983. P. 463-507

Kelly M.A., Rubinstein M., Asa S.L. et al. Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice // Neuron. 1997. Vol. 19. P. 103-113.

Lewinski A., Konopacki J., Pawlikowski M. et al. Effects of intraventricular injections of 6-hydroxydopamine *on anterior pituitary cell proliferation* // Anat. Rec. 1984. Vol. 208. P. 421-426.

Machiavelli G.A., Jahn G.A., Kalbermann L.E. et al. Effect of haloperidol on the synthesis of DNA in the pituitary gland of the rat // Horm. Metab. Res. 1982. Vol. 14. P. 150-153.

McCann S.M., Lumpkin M.D., Mizunuma H. et al. Peptidergic and dopaminergic control of prolactin release // Trends Neurosci. 1984. Vol. 7. P. 127-131.

Missale C., Nash S.R., Robinson S.W. et al. Dopamine receptors: from structure to function // Physiol. Rev. 1998. Vol. 78. P. 189-225.

Mohankumar P.S., Mohankumar S.M., Quadri S.K., Voogt J.L. Chronic hyperprolactinemia and changes in dopamine neurons // Brain Res. Bull. 1997. Vol. 42. P. 435-441.

Mohankumar S.M. Kasturi B.S. Shin A.C. et al. Chronic estradiol exposure induces oxidative stress in the hypothalamus to decrease hypothalamic dopamine and cause hyperprolactinemia // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2010. Vol. 300. № 3. P. 693-699.

Morel G.R., Caron R.W., Console G.M. et al. Estrogen inhibits tuberoinfundibular dopaminergic neurons but does not cause irreversible damage // Brain Res. Bull. 2009. Vol. 80. № 6. P. 347-352.

Okamura H., Kitahama K., Nagatsu I., Geffard M. Comparative topography of dopamine- and tyrosine hydroxylase-immunoreactive neurons in the rat arcuate nucleus // Neurosci. Lett. 1988. Vol. 95. № 1-3. P. 347-3531.

Saiardi A., Bozzi Y., Baik J.H., Borrelli E. Antiproliferative role of dopamine: loss of D2 receptors causes hormonal dysfunction and pituitary hyperplasia // Neuron. 1997. Vol. 19. P. 115-126.

Sarkar D.K. Yen S.S. Hyperprolactinemia decreases the luteinizing hormone-releasing hormone concentration in pituitary portal plasma: a possible role for beta-endorphin as a mediator // Endocrinology. 1985. Vol. 166. № 5. P. 2080-2084.

Serri O., Chik C.L., Ur E., Ezzat S. Diagnosis and management of hyperprolactinemia // Cmaj. 2003. Vol. 169. P. 575-581.

Sheward W.J., Watts A.G., Fink G., Smith G.C. Effects of intravenously administered 6-hydroxydopamine on the content of monoamines in the median eminence and neurointermediate lobe of the rat // Neurosci. Lett. 1985. Vol. 55. P. 141-144.

Torner L., Mejia S., Lopez-Gomez F.J. et al. A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat // Endocrinology. 1995. Vol. 136. № 12. P. 5454-5460.

Troadec J.D., Marien M, Darios F. et al. Noradrenaline provides long-term. protection to dopaminergic neurons by reducing oxidative stress // J. Neurochem. 2001. Vol. 79. № 1. P. 200-210.

Ugrumov M.V. Brain neurons partly expressing monoaminergic phenotype: distribution, development, and functional significance in norm and pathology. 3rd ed. Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology. Ed. A. Lajtha. Neurotransmitter Systems. Ed. S. Vizi. Heidelberg. Springer. 2008. P. 21-73.

Ugrumov M., Melnikova V., Ershov P., Balan I., Calas A. Tyrosine hydroxylase- and/or aromatic L-amino acid decarboxylase-expressing neurons in the rat arcuate nucleus: Ontogenesis and functional significance // Psychoneuroendocrinology. 2002. Vol. 27. № 5. P. 533-548.

Ugrumov M.V., Melnikova V.I., Lavrentyeva A.V. et al. Dopamine synthesis by non-dopaminergic neurons expressing individual complementary enzymes of the dopamine synthetic pathway in the arcuate nucleus of fetal rats // Neuroscience. 2004. Vol. 124. P. 629-635.

Ugrumov M.V., Taxi J., Pronina et al. Neuros expressing individual enzymes of dopamine synthesis in the mediobasal hypothalamus of adult rats: functional significance and topographic interrelations // Neurosci. 2014. Vol. 277. P. 45-54.

Yen S.H. Pan J.T. Nitric oxide plays an important role in the diurnal change of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity and prolactin secretion in ovariectomized, estrogen/progesterone-treated rats // Endocrinology. 1999. Vol. 140. № 1. P. 286-291.

Автоматизация анализа изображений в исследованиях мозга: постановка задач, математические основы, информационные технологии

И.Б. Гуревич, Ю.И. Журавлев, А.А. Мягков, А.А. Колачева, Ю.О. Трусова, В.В. Яшина, Т.С. Пронина, М.В. Угрюмов

Содержание:

1. Введение
2. Автоматизация извлечения информации и знаний из экспериментальных данных
3. Задачи распознавания образов, анализа и распознавания изображений
   3.1. Проблема распознавания изображений
   3.2. Постановка, классы и дескриптивные элементы задач распознавания изображений
4. Автоматизация анализа изображений срезов мозга экспериментальных животных
   4.1. Автоматизация анализа микроскопических изображений нейронов и их отростков
   4.2. Математический метод извлечения терминалей аксонов ДА-ергических нейронов в области стриатума срезов головного мозга мышей
   4.3. Математический метод извлечения тел нейронов в областях черной субстанции и аркуатного ядра срезов головного мозга грызунов
   4.4. Программное обеспечение анализа и распознавания изображений нейронов
5. Заключение

1. Введение

Возможности использования методов и средств математики и информатики в исследованиях мозга и интерпретации их результатов столь же многообразны и широки, как собственно проблематика этих исследований. Общепризнано, что роль математических и информационных методов в естественных науках заключается в:

1) формальной постановке задач исследований;

2) автоматизации обработки, анализа и интерпретации экспериментальных результатов;

Сокращения: АПК – алгоритмическо-программные комплексы; АЯ – аркуатное ядро; БД – базы данных; БЗ – базы знаний; БП – болезнь Паркинсона; ДА – дофамин; ДАИ – дескриптивные алгебры изображений; ДАИ1К – ДАИ с одним кольцом; ДПАИ – дескриптивный подход к анализу и пониманию изображений; КЧС – компактная часть черной субстанции; МИН – микроскопические изображения нейронов; НДЗ – нейродегенеративные заболевания; ПО АРИН – программное обеспечение анализа и распознавания изображений нейронов; SVM – метод опорных векторов.

3) построении математических и имитационных моделей исследуемых объектов и информационных, биологических, физиологических, физических, химических и других материальных и энергетических процессов;

4) проведении машинных экспериментов с математическими и имитационными моделями;

5) принятии интеллектуальных решений на основе анализа результатов исследований и моделирования;

6) извлечении из экспериментальных данных и моделей, структуризации и формальном описании новых знаний.

Эти математические процедуры имеют явно выраженный двойственный характер, поскольку полученные результаты немедленно становятся отправной точкой для постановки и решения новых исследовательских задач (Гуревич, Журавлев, 2010).

Цели и средства математических и информационных исследований мозга можно сформулировать следующим образом:

1) цели:

- выявление принципов и механизмов, определяющих развитие, организацию, обработку информации и умственные способности нервной системы;
- автоматизация извлечения информации и знаний из экспериментальных данных;
- моделирование на уровне отдельных нейронов, сетей нейронов и разделов мозга;

2) средства:

- разработка методов и программного обеспечения для анализа и моделирования;
- разработка, теоретическое и экспериментальное исследование моделей нервной системы и процессов, в ней реализующихся;
- разработка методов, инструментальных средств, баз данных (БД) и баз знаний (БЗ) нейронаук на всех уровнях анализа механизмов деятельности мозга и его функций.

Математические и информационные подходы в настоящее время широко используются в нейронауках, в частности, в таких ее существенных разделах, как молекулярная и клеточная нейронауки, поведенческая нейронаука, системная нейронаука, нейронаука развития, когнитивная нейронаука, теоретическая и вычислительная нейронаука, неврология и психиатрия, нейронная инженерия, нейролингвистика, нейровизуализация. При этом собственно исследования мозга имеют в основном теоретический, алгоритмический и структурный характер и проводятся, главным образом, на следующих структурных уровнях (это относится в первую очередь к работам по моделированию мозга):

- мозг в целом;
- специфические системы мозга (например зрительная система);
- сверхбольшие нейронные сети;
- малые нейронные сети;

- нейроны;
- ионные каналы и синапсы;
- молекулярные процессы.

Важным направлением в моделировании заболеваний, в том числе заболеваний мозга и их диагностике, является получение, хранение, обработка и анализ данных, извлекаемых из цифровых изображений. Изображение является одной из наиболее информативных и распространенных форм представления, передачи и хранения информации и в настоящее время активно используется как средство представления результатов биологических и клинических исследований в основных разделах медицинской науки и практической медицины. Так, например, для углубленного понимания патогенеза, диагностики и лечения нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), в частности болезни Паркинсона (БП), большое значение имеет их экспериментальное моделирование. Разработка моделей могла бы продвигаться гораздо быстрее и была бы экономически эффективнее при снижении временных и материальных затрат на морфологические исследования за счет автоматизации и оптимизации методов обработки и анализа экспериментального материалана основе применения современных алгебраических методов математических теорий анализа изображений и распознавания образов.

Современное состояние математической теории анализа и распознавания изображений позволяет ставить и решать задачи, связанные с созданием стандартизированных тиражируемых информационных технологий и поддерживающих их высоконаукоемких алгоритмическо-программных комплексов (АПК) широкого назначения, а также их специализированных версий, обеспечивающих автоматизацию извлечения информации из медицинских изображений и создающих объективную основу для оптимизации принятия диагностических решений врачами-практиками и врачами-исследователями в интерактивных режимах.

Использование информационных технологий и поддерживающих их АПК позволит увеличить производительность труда врачей-клиницистов и снизить затраты на подготовку экспериментального материала. Кроме того, наличие информационных технологий открывает возможность ставить и решать такие задачи научных исследований, решение которых теряет смысл при отсутствии возможности автоматизировать обработку и анализ получаемых результатов в силу их высокой и специфической информационной насыщенности, сложности и колоссальных объемов экспериментальных данных. В целом создание информационных технологий анализа медицинских и биологических изображений имеет определяющее значение для совершенствования медицинской диагностики в клинических учреждениях и существенному повышению качества медицинской помощи.

В данной главе описаны возможности и основные результаты математических и информационных исследований мозга. Приведены примеры эффективного использования математических и информационных подходов для автоматизации обработки, анализа и оценивания экспериментальных данных, получаемых при исследовании мозга.

2. Автоматизация извлечения информации и знаний из экспериментальных данных

Теоретической и методической основой автоматизации обработки, анализа и оценивания экспериментальных данных, получаемых при исследовании мозга, являются математическая теория распознавания образов и математическая теория анализа изображений (Верхаген и др., 1985; Горелик и др., 1985; Журавлев, 1978; Журавлев, Гуревич, 1989; Dougherty, 2012; Grenander, 1993; Gurevich, 1991; Gonzalez, Woods, 2002; Jahne, 2005; Petrou, Petrou, 2010; Rosenfeld, Kak, 1982; Russ, 2011; Soille, 2004; Solomon, Breckon, 2010; Sonka et al., 2014; Tanimoto, 2012).

Основное назначение методов распознавания образов – отнесение предъявленного объекта к одному из заданных классов на основе анализа прецедентов (вычисление значений метрики близости) в многомерном признаковом пространстве при помощи постановки и решения задач следующих типов:

а) идентификация и классификация объектов;

б) разбиение множества заданных объектов на непересекающиеся классы (кластерный анализ);

в) оценка информативности характеристик (признаков) распознаваемых объектов;

г) построение формализованных описаний распознаваемых объектов (в т.ч. с помощью дескриптивных алгебр, векторов признаков, логических формул, формальных грамматик).

Распознавание образов как наука возникло и сформировалось в результате необходимости решать задачи анализа и оценивания плохо структурированной, неформализованной, нечёткой, неполной, противоречивой, семантически насыщенной и зашумленной информации с помощью вычислительно эффективных математических методов. Исходной информацией в этих задачах служат числовая, символьная и экспертная информация, изображения, речь, сигналы произвольного вида, тексты, документы, схемы и чертежи, а также произвольные комбинации указанных разновидностей исходных данных.

Методы и средства распознавания образов предназначены для решения прикладных интеллектуальных задач принятия решений, диагностики, идентификации и прогнозирования.

Основу современной математической теории распознавания образов составляет «Алгебраический подход к решению задач распознавания и классификации» (Журавлев, 1978). Для случая представления исходной информации в виде изображений осуществлена его специализация – предложен и развивается дескриптивный подход к анализу и пониманию изображений (ДПАИ) (Gurevich, 1991). Основной целью ДПАИ является структурирование разнообразных методов, операций и представлений, используемых в анализе и распознавании изображений, причём формальные конструкции ДПАИ обеспечивают способы и инструменты представления и описания изображений для их последующего анализа и оценивания. В рамках развития ДПАИ решаются следующие задачи:

а) определение способов представления исходной и промежуточной информации в задачах обработки, анализа и распознавания изображений;

б) разработка математического аппарата для единообразного описания моделей изображений и моделей преобразований, обеспечивающих их построение и решение задач распознавания;

в) построение стандартизированных алгоритмических схем и их реализация в виде элементов информационных технологий анализа изображений.

В рамках ДПАИ выделены три функциональные группы задач:

1) обработка изображений – повышение качества изображений для улучшения их визуального восприятия человеком, обработка изображений для их хранения, представления и передачи, преобразование изображений с целью повышения эффективности их дальнейшего анализа и распознавания;

2) анализ изображений – применение к ним системы преобразований, обеспечивающей извлечение из изображения полезной информации о свойствах изображаемого объекта/процесса; результатом анализа изображений является приведение изображения к виду, удобному для распознавания, т.е. построение формального описания – модели изображения;

3) распознавание изображений – отнесение изображения/его фрагментов/представленных на нём объектов к некоторому классу, либо разбиение множества изображений/его фрагментов/представленных на нём объектов на несколько классов.

В области распознавания образов и анализа изображений выделяют следующие основные стадии «алгебраизации»:

- Математическая морфология: Г. Матерон, Ж. Серра (1970-е);
- Алгебра алгоритмов: Ю.И. Журавлев (1970-е – настоящее время);
- Теория образов: У. Гренандер (1970-е – настоящее время);
- Теория категорий в области распознавания образов: М. Павел (1970-е);
- Алгебра изображений: Ж. Серра, С. Стернберг (1980-е);
- Стандартная алгебра изображений: Г. Риттер (1990-е – настоящее время);
- Дескриптивные алгебры изображений (ДАИ): И. Гуревич (1990-е – настоящее время);
- ДАИ с одним кольцом (ДАИ1К): И. Гуревич, В. Яшина (2002 – настоящее время).

Роль изображения как объекта анализа и оценивания определяется его специфическими и неотъемлемыми информационными свойствами. Изображение представляет собой некоторую совокупность отображаемых исходных данных и средств их представления, результатов процессов формирования представлений изображения и процедур их преобразований, физических и логических аспектов и моделей объектов, событий и процессов, представленных на изображении.

Специфичность и сложность задач анализа и оценивания изображений связана с необходимостью достижения некоторого баланса между такими противоречивыми факторами, как цели и задачи анализа, природа зрительного восприятия, способы и средства получения, формирования и представления изображений, и математическими, вычислительными и технологическими инструментами анализа изображений.

Разработка математического аппарата, обеспечивающего теоретическую основу автоматизации обработки, анализа, оценивания и понимания изображений, является одной из фундаментальных задач информатики. Автоматизация обработки

и анализа изображений обеспечивает разработчикам автоматизированных систем, предназначенных для работы с изображениями, и конечным пользователям, в т.ч. не являющимся специалистами в области информатики и прикладной математики, возможность в автоматическом или интерактивном режимах:

а) разрабатывать, адаптировать и проверять методы и алгоритмы распознавания, понимания и оценивания изображений;

б) выбирать оптимальные или адекватные методы и алгоритмы распознавания, понимания и оценивания изображений;

в) проверять качество исходных данных и их пригодность для решения задачи распознавания изображений;

г) использовать стандартные алгоритмические схемы распознавания, понимания, оценивания и поиска изображений.

К настоящему времени анализ и оценивание изображений накопили обширный опыт применения математических методов из различных разделов математики, информатики и физики, в частности, алгебры, геометрии, дискретной математики, математической логики, теории вероятностей, математической статистики, математического анализа, математической теории распознавания образов, цифровой обработки сигналов, оптики.

Анализ и понимание изображений для математиков оказались весьма трудной задачей, поскольку изображение – крайне неудобная для математической обработки форма представления информации. В задачах, связанных с исследованиями мозга, приходится работать с динамическими изображениями, что ещё больше усложняет анализ. Работа с такими нетрадиционными видами информации для математиков достаточно долго не являлась предметом интересов, это направление не развивали. Серьёзные изыскания начались в 1950-е годы, они активно продолжаются и сегодня. К настоящему времени выделена целая совокупность математических методов, которые позволяют приводить изображение к виду, допускающему применение эффективных алгоритмов распознавания. Такие формализованные представления изображения (модели – изображения, приведённые к виду, удобному для распознавания) – необходимая основа для моделирования, распознавания, вычисления характеристик, выделения регулярностей и свойств, принятия интеллектуальных решений. Эти методы в фундаментальной части в определённой мере отработаны и многократно практически проверены. В этом смысле вполне правомерно говорить о формировании математической теории анализа изображений и достижении ею определённой степени зрелости, но она ещё не достигла степени развития математической теории распознавания образов, существенные элементы которой используются при работе с изображениями.

Чрезвычайно существенен вклад в математические теории распознавания образов и анализа изображений отечественной математической школы, фундаментальные результаты которой, в частности в области алгебраических методов распознавания образов и анализа изображений, определяют в настоящее время мировой уровень (Журавлев, 1978; Gurevich, 1991).

В рамках указанных теорий и прикладных разработок, выполненных на их основе, учёные и специалисты, занятые исследованием мозга, могут найти обшир-

ный набор методов и средств, необходимых для перехода к реальной автоматизации научных исследований, извлечения информации и знаний из результатов экспериментальных исследований и, в некоторой степени, для моделирования мозга и его функций. Для прикладного анализа изображений разработаны и готовы к использованию стандартные постановки задач, алгоритмические схемы и алгоритмические библиотеки. Используя эти инструменты, исследователь может синтезировать необходимую алгоритмическую схему обработки и анализа данных из стандартных алгоритмических блоков. Следующим этапом развития является разработка на базе этого инструментария стандартных информационных технологий и АПК, специализированных для обработки и анализа данных, получаемых при исследованиях мозга.

3. Задачи распознавания образов, анализа и распознавания изображений

В данном разделе будут рассмотрены основные условия, выполнение и исследование которых необходимо для порождения и извлечения знаний на основе анализа экспериментальных данных в биомедицинских исследованиях с помощью методов математических теорий распознавания образов и анализа изображений. Указанные условия включают:

а) адекватную задачам исследования содержательную и математическую постановку задач анализа данных;

б) анализ соответствия и объема имеющихся данных для решения поставленных задач;

в) выбор методов и алгоритмов решения поставленных задач;

г) характеризацию объектов анализа и построение формализованных моделей данных;

д) интерпретацию полученных результатов и получение математических оценок точности и качества решения.

3.1. Проблема распознавания изображений

При работе с исходной информацией, задаваемой в виде изображений, возникают следующие задачи распознавания:

1) сопоставление двух изображений в целом для установления их принадлежности к данному классу (определяется,представляют ли изображения один и тот же объект или сцену);

2) сопоставление изображения в целом с набором или серией последовательных (по времени) изображений, представляющих некоторый класс изображений (т.е.объектов или сцен) (цель – та же, что и в задаче 1);

3) задачи 1 и 2 для случая нескольких классов;

4) поиск на предъявленном на распознавание изображении некоторой регулярности/нерегулярности, объекта, ситуации, на которую следует обратить внимание,

хотя она и не задавалась в априорном перечне эталонов (ассоциативный поиск; ограниченно детерминированный набор классов – задачи логической и семантической фильтрации в сочетании с самообучением);

5) поиск на предъявленном на распознавание изображении регулярности/нерегулярности, фрагмента заданного вида;

6) разбиение множества изображений на непересекающиеся подмножества (задача автоматической классификации);

7) решение задачи автоматической классификации на одном изображении (разбиение изображения на однородные области, группы объектов, сегментация области, выделение признаков объектов);

8) совместное решение задач (6) и (7);

9) автоматическое выделение непроизводных элементов, характерных объектов изображения, признаков-объектов, пространственных и логических отношений длясинтезаформализованных описаний изображения;

10) приведение изображения к виду, удобному для распознавания; автоматический синтез формализованных описаний изображения;

11) задачи восстановления:

- пропущенных кадров в последовательности изображений;
- изображений в целом по их фрагментам;
- фрагментов изображения (и объектов) на основенепроизводных элементов, признаков и порождающих процедур с учетом контекста всего изображения в целом;
- траектории задачи по ее фрагментам и неизвестных фрагментов траекторий;

12) декомпозиция задачи обработки и анализа изображения на элементарные базисные подзадачи;

13) выбор и формирование траектории задачи распознавания изображений (в соответствии с задачей распознавания со стандартной обучающей информацией);

14) решение задач (1–13) в случаях наличия на изображениях динамических объектов, сложной фоновой обстановки (в том числе динамических и статических помех) и с учетом способа получения, формирования и представления изображений.

Классическая постановка задачи распознавания со стандартной обучающей информацией (Журавлев, 1978) заключается в следующем.

Пусть дано множество М объектов ω: на этом множестве постулируется разбиение на конечное число подмножеств (классов) Ω_i, $i=1,...,m$, $M=\bigcup_{i=1}^{m}\Omega_i$. Разбиение M определено не полностью – задана лишь некоторая информация I_0о классах Ω. Объекты ω задаются значениями некоторых признаков x_j, $j=1,...,N$ (этот набор всегда один и тот же для всех объектов, рассматриваемых при решении одной и той же задачи). Совокупность значений признаков x_j определяет описание $I(\omega)$ объекта ω. Каждый из признаков может принимать значения из различных множеств допустимых значений признаков, например из следующих: $\{0, 1\}$ — признак не выполнен или выполнен соответственно; $\{O, 1, \Delta\}$ — информация о признаке

отсутствует: $\{0, 1, ..., d–1\}$ – степень выраженности признака имеет различные градации, $d>2$; $\{a_1, ..., a_d\}$– признак имеет конечное число значений; $d>2$; $[a, b]$, $(a, b]$, $[a, b)$, a, b – произвольные числа или символы $-\infty, +\infty$. Кроме того, значениями признака x_j могут являться функции некоторого класса или функции распределения некоторой случайной величины.

Описание объекта $I(\omega)=(x_1(\omega),...x_N,(\omega))$ называют стандартным, если $x_j(\omega)$ принимает какое-либо значение из множества допустимых.

Задача распознавания со стандартной информацией состоит в том, чтобы для данного объекта ω и набора классов по обучающей информации $I_1(\Omega_1... \Omega_m)$ о классах и описанию $I(\omega)$ вычислить значения предикатов $P_i(\omega)$ – «$\omega \in \Omega_i$», $i=1,...,m$. Информация о вхождении объекта ω в класс Ω_i кодируется символами «1» ($\omega \in \Omega_i$), «0» ($\omega \in \Omega_i$), Δ – неизвестно, принадлежит ли ω классу Ω_i или нет, и записывается в виде так называемого информационного вектора:

$$\tilde{\alpha}(\omega)=\left(\alpha_1(\omega),...,\alpha_m(\omega)\right),\ \alpha_i \in \{0,\ 1\ \Delta\}. \tag{2.1}$$

Стандартной информацией

$$I_1(\Omega_1... \Omega_m) \tag{2.2}$$

называют совокупность множеств $(I(\omega_1),...,I(\omega_{T_m}))$ и $(\tilde{a}(\omega_1),..., \tilde{a}(\omega_{T_m}))$ (предпо-лагается, что среди информационных векторов нет вектора вида $(\Delta....,\Delta)$). Считается, что объекты $\omega_2,..., \omega_i$ принадлежат классу Ω_1, объекты $\omega_{r_{i-1}+1},...,\omega_{r_i}$ принадлежат классу Ω_1 и объекты $\omega_{r_{m-1}+1},...,\omega_{r_m}$ – классу Ω_1.

Таким образом, любой алгоритм распознавания переводит задачу распознавания z с q распознаваемыми объектами и m классами в матрицу ответов $\|\alpha_{ji}\|_{qxm}$ — информационную матрицу, строками которой являются информационные векторы (2.1) для каждого из распознаваемых объектов ω^j, $j=1,...,q$.

Процесс переработки распознающим алгоритмом исходной информации в информационную матрицу ответов распадается на две последовательные стадии.

На первой из них осуществляется перевод исходной информации в некоторую числовую матрицу $\|\alpha_{ji}\|_{qxm}$ стандартного размера с числом строк, равным числу распознаваемых в задаче z объектов, и числом столбцов, равным числу классов, рассматриваемых при решении задачи z:

$$B\left(I, \Omega^m, \omega^j\right)=\|\alpha_{ji}\|_{qxm}\ . \tag{2.3}$$

Вторая стадия работы распознающего алгоритма сводится к переработке этой числовой матрицы в матрицу окончательных ответов $\|\alpha_{ji}\|_{qxm}$ с тем же числом строк и столбцов:

$$C\left(\left\|\alpha_{ji}\right\|_{qxm}\right)=\left\|\alpha_{ij}\right\|_{qxm}\ . \qquad (2.4)$$

Это означает, что всякий алгоритм распознавания можно представить в виде двух последовательно выполняемых алгоритмов (Журавлев, 1978). Первый из них – распознающий оператор B, который выполняет основную часть процесса переработки информации, второй — решающее правило C, которое в принципе для всех распознающих алгоритмов может быть одинаковым.

Формализация задачи распознавания с помощью понятия стандартной информации (2.2) и матриц вида (2.3) и (2.4) применима в чистом виде при работе с такими видами информации, как результаты наблюдений, измерений, осмотра, экспертные оценки и т.п. Формальные описания объектов распознавания – модели – в этих случаях сравнительно просты, а требования к организации и представлению исходной информации минимальны, вполне допустимо ограничиваться простыми таблицами типа «признак – значение признака». Основная особенность таких моделей объектов распознавания состоит в том, что они представляются некоторым набором характеристик, взаимосвязь и взаимоотношения которых, вообще говоря, игнорируются. При этом предполагается, что каждый объект отождествляется с некоторой точкой многомерного признакового пространства, а класс объектов представляется «компактным» множеством таких точек.

Объектами распознавания могут служить изображения, полученные в различных частях спектра излучений (оптические, инфракрасные, ультразвуковые и т.д.) различными способами (телевизионные, фотографические, лазерные, радиолокационные, радиационные и т.д.), преобразованные в цифровую форму и представленные в виде некоторой целочисленной матрицы. Для кодирования изображений обычно используются стандартные методы эффективного кодирования. В качестве средств представления изображений используются растровое представление, позиционное представление, древовидные структуры данных, эскизы Марра, фреймовые конструкции и дескриптивные модели, записанные на языке ДАИ. Способ получения и формирования изображения на результат распознавания, вообще говоря, не должен влиять, но может учитываться в системе в качестве дополнительной информации.

При работе с информацией, представленной в виде изображений, выделяют несколько уровней обработки информации. На нижнем уровне — уровне предварительной обработки — на изображении выделяются непроизводные элементы и простейшие признаки (яркостные переходы, ориентация яркостных переходов). На следующем — промежуточном — уровне обработки выделяются обобщенные признаки (линии и области), а также извлекается информация о форме объектов (ориентации поверхностей и их наложения друг на друга) (уровень сегментации). На высшем уровне обрабатываются «объекты»; целью является получение описания сцены, и в основе обработки лежит использование знаний о соответствующей проблемной области.

При переходе к задачам распознавания изображений возникают математические задачи, связанные с формальным описанием изображения как объекта анализа. Последний, главным образом, опирается на рассмотрение параметров четырех типов: контраста, яркости (цвета), формы и текстуры.

Задачи, связанные с получением формальных описаний изображений как объектов анализа и формированием и выбором процедур распознавания, решаются при помощи изучения внутреннего строения, структуры и содержания изображения как результата тех операций, при помощи которых изображение может быть построено из «подызображений» и других объектов более простой природы, т.е. непроизводных элементов и объектов, выделяемых на изображении на различных этапах работы с ним (в зависимости от того, применительно к какому морфологическому и/или масштабному уровню формируется модель изображения). Поскольку этот способ характеризации изображения является операциональным, весь процесс обработки и распознавания изображения, включая построение формального описания — модели изображения, можно рассматривать как реализацию на изображении некоторой системы преобразований, которые определены на классах эквивалентности, представляющих ансамбли допустимых изображений. Из этого следует, что работа ведется с иерархией формальных описаний изображений, т.е. в процессе распознавания используются модели изображения, относящиеся к разным морфологическим (масштабным) уровням, в сущности, многоуровневые модели, которые позволяют выбирать и изменять в процессе решения необходимую степень подробности описания объекта распознавания.

При распознавании (при формализации изображения как объекта распознавания) «содержание» изображения характеризуется информацией трех типов: а) идентифицируемые объекты с хорошо определенной структурой; б) идентифицируемые объекты с плохо определенной структурой; в) неидентифицируемые объекты.

В процессе распознавания изображения должна использоваться информация, отражающая механизм формирования образа, т.е. как изображения в целом, так и объектов, на нем представленных. Учет структуры изображений сводится к определению того, какие подызображения — объекты — можно выделить на изображении, насколько они могут или должны быть элементарны и в каких отношениях пребывают эти объекты и элементы. Следовательно, в основе ввода структурной информации в описание объектов распознавания лежит изучение и использование структур отношений элементов, составляющих изображение. Реализуется этот метод при помощи построения модели изображения в виде иерархической структуры более простых объектов. В результате удается в явном виде представлять и использовать иерархическую структурную информацию, содержащуюся в изображении: изображение описывается через некоторую систему объектов, каждый объект описывается с помощью более простых объектов, последние снова описываются с помощью более простых объектов и т.д.

Вводить структурную информацию в процесс распознавания можно двумя способами.

Во-первых, можно сохранить перечень признаков как основной принцип формализации, причем: а) в описание вводятся такие признаки, которые характеризуют

взаимосвязи (отношения) отдельных признаков; б) самим признакам присваиваются веса, указывающие степень их существенности для описания объекта; в) отдельные признаки объединяются в комплексы и рассматриваются как один признак.

Второй способ введения структурной информации в процесс распознавания использует то обстоятельство, что такая информация представляет свойственную реальному миру регулярность, проявляющуюся в возникновении различных упорядоченностей и структур. Математическим аналогом этой идеи служит аппарат комбинаторных регулярных структур, обеспечивающий к тому же возможность учитывать иерархичность строения изображений как объектов распознавания (Grenander, 1993). Обращение к комбинаторным регулярным структурам позволяет, оперируя весьма ограниченным количеством непроизводных элементов и ограниченным набором правил комбинирования, при помощи неограниченного их применения к исходным непроизводным элементам и результатам применения отдельных комбинаторных преобразований получать практически неограниченное разнообразие описаний.

Наиболее перспективным является подход, предусматривающий введение пространства формализации изображений и построение в нем многоуровневых представлений и моделей изображений, допускающих применение эффективных алгоритмов распознавания (Gurevich, Yashina, 2012).

При сведении анализа изображений к решению задачи распознавания очень существенно уметь правильно выбирать некоторый алгоритм распознавания из множества известных, т.е. естественным образом возникает проблема выбора в конкретной ситуации наилучшего в некотором смысле алгоритма. Очевидно, что при распознавании изображений, как и при решении задач распознавания со стандартной обучающей информацией, систематизация выбора наилучшего алгоритма непосредственно связана с формализацией теории распознавания изображений, в частности, понятия алгоритма распознавания изображений.

Известно (Журавлев, 1978), что необходимость ставить и решать задачу выбора алгоритма, экстремального по функционалу качества распознавания, потребовала введения понятия модели распознающего алгоритма. Потребность в синтезе моделей алгоритмов распознавания в первую очередь определялась необходимостью фиксировать каким-либо образом класс алгоритмов при выборе оптимальной или приемлемой процедуры решения конкретной задачи.

Введение понятия модели распознающего алгоритма позволяет изучать множества некорректных процедур распознавания (т.е. эвристических, не имеющих математического обоснования, но выдержавших экспериментальную проверку при решении реальных задач распознавания) с помощью строгих математических методов. Анализ совокупности некорректных алгоритмов распознавания позволяет по мере их накопления выделять и описывать не только отдельные частные алгоритмы, но и методы их формирования. Эти методы, действующие уже над подмножествами алгоритмов и формируемые сначала также в плохо формализованном виде, затем могут превращаться в точные математические описания. На этом этапе эвристический характер имеет собственно выбор метода, а алгоритмы, порождаемые на основе соответствующего метода, могут строиться стандартным образом.

Именно в таком смысле формализация различных методов построения распознающих алгоритмов приводит к появлению моделей распознающих алгоритмов.

Построение модели распознающего алгоритма связано с получением единообразных описаний для множеств некорректных, но успешно решающих практические задачи процедур. Подобное множество задается указанием переменных, объектов, функций, параметров и точным определением областей их вариации, представляя, таким образом, искомую модель алгоритма. Фиксация некоторого набора соответствующих переменных, объектов, параметров и типов функций позволяет выделить из рассматриваемой модели некоторый конкретный алгоритм.

Построение модели алгоритма распознавания изображений и определение соответствующего класса алгоритмов распознавания не сводятся, к сожалению, к механическому переносу в область изображений понятия модели распознающего алгоритма, выработанной в математической теории распознавания (Журавлев, 1978), и непосредственному использованию формальных представлений ряда известных моделей распознавания, изученных в классической теории распознавания. Дело в том, что характер и содержание задачи распознавания изображений отличаются от свойственных классической постановке математической теории распознавания.

Определим основные особенности задачи распознавания изображений.

1) Построение формального описания — модели изображения как объекта распознавания — становится самостоятельной задачей, разрешаемой в процессе распознавания.

2) Модель изображения должна включать структурную или, по меньшей мере, реляционную информацию, т.е. она должна представлять собой некоторую формальную конструкцию, при получении которой последовательно проводится принцип учета иерархичности структуры объекта распознавания и отношений, существующих между отдельными элементами этой иерархии как в пределах одних и тех же уровней, так и между ними.

3) Изменяются понятия начальной и финальной информации. Процесс распознавания изображений имеет многоуровневый характер, при котором исходная модель изображения в результате применения к ней процедуры распознавания преобразовывается в модель изображения, относящуюся к другому морфологическому (масштабному) уровню; к полученной модели снова применяется процедура распознавания и т.д., причем правило остановки определяется видом результатов, требующихся при решении рассматриваемой задачи.

4) Тесная связь процессов описания и распознавания изображений и необходимость включения в итерационный процесс распознавания моделей изображения, относящихся к различным морфологическим (масштабным) уровням, означают, что алгоритм распознавания изображения включает помимо распознающего оператора и решающего правила оператор, осуществляющий приведение изображения к виду, удобному для распознавания:

$$R_f^n\left(I_n\right) = P_n\left(I, \Omega^m, \omega^j\right),\ n=1,\ldots,\ t, \tag{2.5}$$

где I_n – изображение, соответствующее некоторому морфологическому (масштабному) уровню описания n; $P_n\left(I, \Omega^m, \omega^j\right)$ – модель изображения на n-м морфологическом (масштабном) уровне описания, полученная в результате применения оператора приведения изображения к виду, удобному для распознавания, R_f^n. Распознающий оператор В (2.3), естественно, применяется к модели P_n, а результат его применения может представлять собой снова модель изображения P_{n+m}, относящуюся к некоторому «нижнему» морфологическому (масштабному) уровню или иному уровню выбранной иерархии представлений изображения.

Указанные особенности задачи распознавания изображений позволяют определить класс процедур распознавания, характеризующихся некоторой фиксированной структурой, которая задается последовательным применением троек операций R_f^n (2.5), В (2.3) и C (2.4); интерпретация процедуры, т.е. конкретные виды преобразований $\{T^F\}$ и $\{T^A\}$, обеспечивающих переработку информации в процессе распознавания, определяются целями и типом проводимого анализа:

$$T^F : I_n \to P_n\left(I^*\right); \tag{2.6}$$

$$T^A : P_n\left(I^*\right) \to I^R, \tag{2.7}$$

где $P_n\left(I^*\right)$ – модель наблюдаемого изображения, соответствующая морфологическому (масштабному) уровню n; I^R – регулярность, выявляемая на изображении в процессе решения задачи распознавания (Журавлев, Гуревич, 1989).

3.2. Постановка, классы и дескриптивные элементы задач распознавания изображений

В настоящее время принято выделять три функциональные группы задач, возникающих в процессе работы с изображениями: задачи обработки изображений, задачи анализа изображений и задачи распознавания изображений. Отнесение той или иной задачи к той или иной группе является в некотором смысле субъективным, поскольку в силу специфики предметной области некоторые задачи, входящие в одну из указанных групп, могут относиться к другим группам. Иногда разграничение делается по тому принципу, что к задачам обработки изображений относятся задачи, в которых как входной, так и выходной информацией служат изображения, в то время как задачей анализа изображений является построение двухмерной модели изображения и вычисление специфических характеристик или признаков, необходимых для ее построения.

Для разбиения задач на группы внутри каждой из трех выделенных категорий может быть использована тематическая и техническая классификации (Гуревич, Трусова, 2009). К тематическим задачам относятся задачи, определяющие цель преобразований изображения, а также задачи, которые соответствуют основным видам решений, которые принимаются по информации, представленной в виде изображений. Технические задачи – это элементарные задачи, необходимые для решения тематических задач.

Целью цифровой *обработки изображений*, как правило, является повышение качества изображений для улучшения его визуального восприятия человеком, обработка изображений для их хранения, представления и передачи в системах машинного зрения или преобразование изображений таким образом, чтобы повысить эффективность их дальнейшего анализа и распознавания.

Ниже перечислены тематические задачи обработки изображений.

1) сжатие изображений – сокращение объема данных, требуемого для представления изображений;

2) улучшение качества изображений – задача, целью которой является либо улучшение визуального восприятия изображения (выявление плохо различимых деталей или подчеркивание интересующих характеристик на изображении, например повышение контраста изображения), либо преобразование его в форму, более удобную для визуального или машинного анализа; при этом не делается попытки приблизить воспроизводимое изображение к некоторому идеализированному оригиналу (это цель задачи восстановления изображений); в некоторых случаях искаженное изображение субъективно воспринимается лучше, чем неискаженный вариант (Pratt, 2007);

3) восстановление изображений – коррекция изображений (устранение геометрических и других искажений, полученных, например, в процессе получения изображений).

К техническим задачам обработки изображений относятся следующие:

1) преобразования, заключающиеся в применении к изображениям арифметических операций (например, сложение, вычитание и т.д.);

2) геометрические преобразования изображений (евклидовы, аффинные, проективные, полиномиальные преобразования и т.д.);

3) яркостная и цветовая коррекция изображений;

4) преобразование контраста изображений;

5) преобразование гистограммы изображений (например, выравнивание или «растягивание» гистограммы);

6) усиление яркостных переходов на изображении;

7) удаление (подавление) шума на изображении;

8) фильтрация изображений;

9) сглаживание изображений;

10) повышение резкости изображений;

11) бинаризация тоновых изображений;

12) кодирование изображений;

13) дискретизация и квантование изображений.

Классификация задач обработки изображений представлена на рис. 1.

Под *анализом изображения* понимается применение к нему системы преобразований, обеспечивающей извлечение из изображения полезной информации о свойствах изображаемого объекта или процесса. Результатом анализа изображений является приведение изображения к виду, удобному для распознавания, т.е. построение формального описания – модели изображения (Гуревич, 2008).

Ниже перечислены тематические задачи анализа изображений:

1) выделение непроизводных элементов, групп пикселов – обнаружение углов,

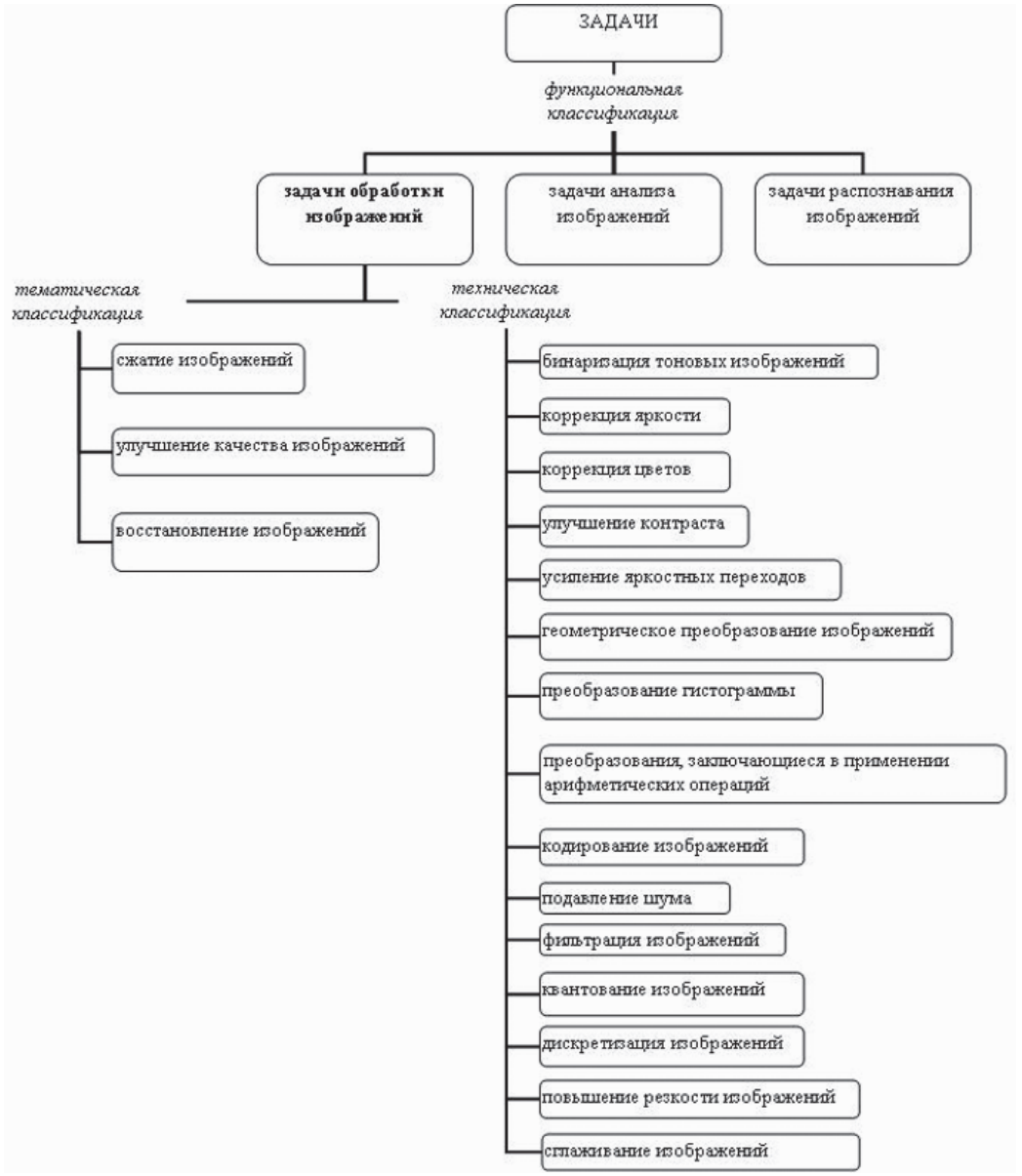


Рис. 1. Задачи обработки изображений

яркостных переходов, границ областей, локальных окрестностей, областей, кривых и т.д.;

2) сегментация изображений – разбиение изображения на однородные области или выделение областей с заданными свойствами;

3) построение описаний выделенных непроизводных элементов, групп пикселов;

4) выбор, выделение и вычисление значений признаков изображений, признаков фрагментов изображений или признаков групп пикселов, используемых при построении моделей изображений;

5) построение и описание моделей изображений;

6) описание двухмерных объектов на изображении;

7) реконструкция изображений – восстановление изображений в целом по их фрагментам; восстановление фрагментов изображения (и объектов) на основе непроизводных элементов и признаков, восстановление пропущенных кадров в последовательности изображений.

К техническим задачам анализа изображений относятся следующие:

1) связывание и классификация яркостных переходов;

2) прослеживание, группировка и представление границ областей;

3) построение остова области;

4) выделение, заполнение и анализ контуров;

5) сегментация кривых;

6) разбиение, заполнение, классификация и представление областей.

Классификация задач анализа изображений представлена на рис. 2.

Задачей *распознавания изображений* является отнесение изображения, его фрагментов или представленных на нем объектов к некоторому классу, либо разбиение множества изображений, его фрагментов или представленных на нем объектов на несколько классов. Иногда в состав задачи распознавания включают приведение изображения к виду, удобному для распознавания, причем на этапе собственно распознавания в качестве исходной информации выступают модели и представления изображения, его фрагментов или воспроизведенных на нем объектов.

В качестве тематических задач распознавания, возникающих при работе с исходной информацией, представленной в виде изображении, выделяют следующие (Журавлев, Гуревич, 1989):

1) преобразование и оценивание моделей и представлений изображений;

2) сопоставление двух изображений в целом для установления их принадлежности к одному классу;

3) сопоставление изображения в целом с набором или серией последовательных (по времени) изображений, представляющих некоторый класс изображений (цель – та же, что и в задаче 2);

4) задачи (2) и (3) для случая нескольких классов;

5) поиск на предъявленном на распознавание изображении некоторой регулярности/нерегулярности (объекта, ситуации), на которую следует обратить внимание, хотя она и не задавалась в априорном перечне эталонов;

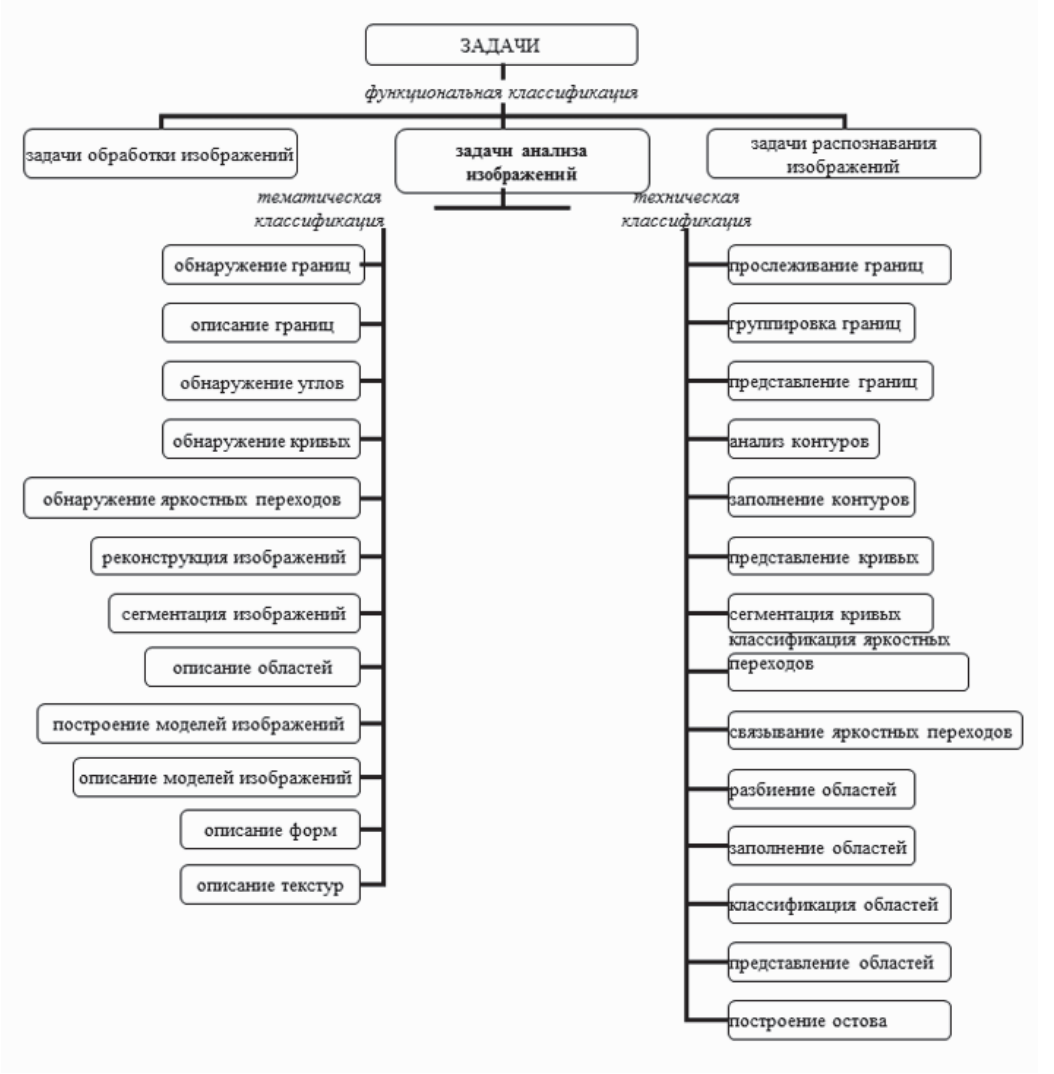


Рис. 2. Задачи анализа изображений

6) поиск на предъявленном на распознавание изображении регулярности/нерегулярности/фрагмента заданного вида;

7) разбиение множества изображений на непересекающиеся подмножества (задача автоматической классификации);

8) выбор и формирование траектории задачи распознавания изображений (в постановке задачи распознавания со стандартной обучающей информацией);

9) решение задач (2)–(8) в случаях наличия на изображениях динамических объектов, сложной фоновой обстановки (в т.ч. динамических и статических помех) и с учетом способа получения, формирования и представления изображений.

К техническим задачам распознавания изображений относятся:

1) приведение изображения к виду, удобному для распознавания:

а) оценка информативности и адекватности признаков, использованных при построении модели изображения, фрагментов изображения или представленных на нем объектов;

б) определение и оценивание статистических характеристик признаков изображения, фрагментов изображения или представленных на нем объектов;

в) оценка адекватности модели изображения, фрагментов изображения или представленных на нем объектов;

2) выбор модели алгоритмов распознавания для использования при решении предъявленной задачи распознавания;

3) выбор алгоритма в выбранной модели алгоритмов;

4) адаптация, обучение и модификация выбранного алгоритма применительно к предъявленной задаче распознавания;

5) комбинирование алгоритмов с целью решения предъявленной задачи распознавания и построение алгоритмической схемы, обеспечивающей решение задачи.

Классификация задач распознавания изображений представлена на рис. 3.

В рамках проблемы обработки, анализа и распознавания изображений существуют многочисленные классификации разработанных и используемых методов работы с изображениями, исходя из некоторых общих свойств, так, например, ме-

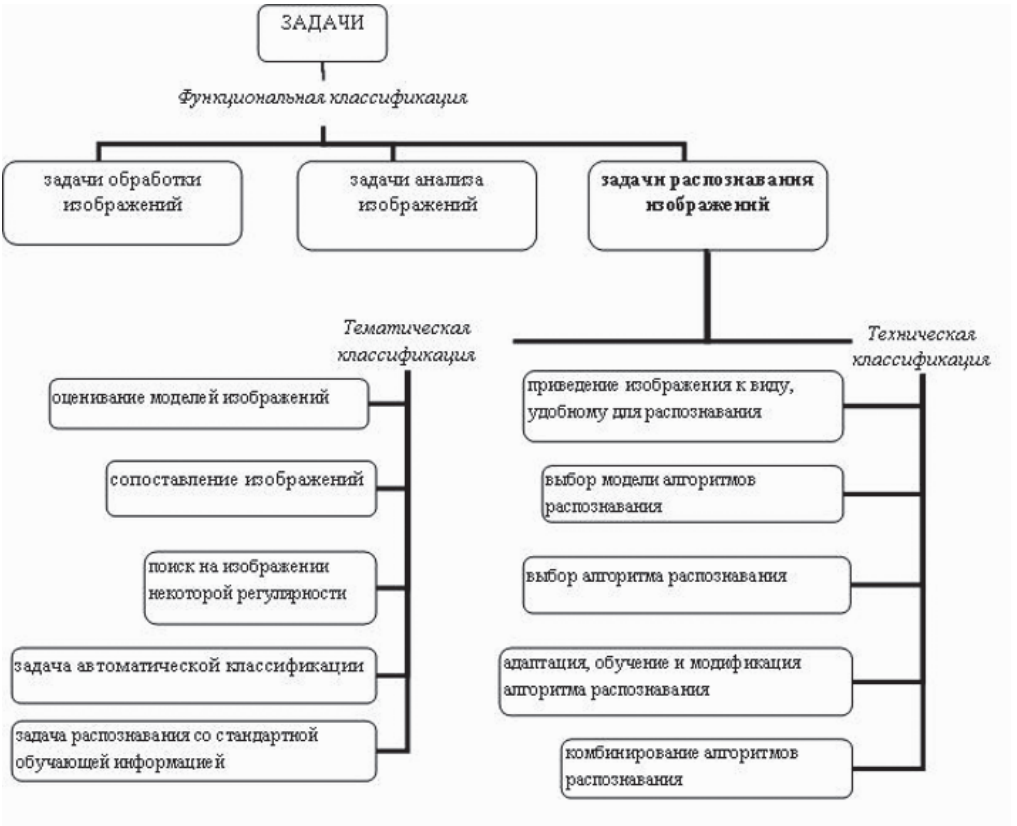


Рис. 3. Задачи распознавания изображений

тоды сжатия изображений обычно делят на методы сжатия без потерь и методы сжатия с потерями; методы восстановления изображений – на стохастические и детерминированные; пространственные и частотные; адаптивные и неадаптивные; одношаговые, итерационные и рекурсивные; методы фильтрации изображений – на линейные и нелинейные и т.д.

Наиболее естественным является разбиение методов на группы в соответствии с тем, для решения какой задачи или задач тот или иной метод может быть использован. Приведенная выше классификация задач обработки, анализа и распознавания изображений является надежной основой для построения базовой непротиворечивой классификации методов, т.е. каждой выделенной задаче ставится в соответствие группа методов, используемых для ее решения, например, методы фильтрации изображений, методы обнаружения яркостных переходов и т.д.

Одним из наиболее существенных необходимых условий «обоснованного» решения задач анализа и распознавания изображений является построение формального описания исходных данных, в основе которого лежат дескриптивные элементы описания (в классической задаче распознавания – признаковое пространство): их выбор, формирование, вычисление значений, установление логических, функциональных и статистических зависимостей и отношений между дескриптивными элементами, оценивание их информативности. На рис. 4 приведена классификация признаков, обычно используемых в качестве дескриптивных элементов в задачах распознавания.

4. Автоматизация анализа изображений срезов мозга экспериментальных животных

Данный параграф посвящен автоматическим методам и реализующим их алгоритмическим схемам, разработанным для решения математических задач, возникающих в связи с обнаружением, идентификацией и характеризацией нейронов на микроскопических изображениях срезов головного мозга экспериментальных животных. Тестирование и интерпретация разработанных математических методов проиллюстрированы на примере анализа изображений с цельюполучения количественных характеристик экспериментальной модели доклинической стадии БП.

Содержательная постановка прикладной биологической задачи и микроскопические изображения срезов головного мозга, содержащие нейроны, предоставлены Лабораторией нервных и нейроэндокринных регуляций ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук» (руководитель – академик РАН М.В. Угрюмов).

Оценка эффективности разработанных методов и интерпретация полученных результатов проведена совместно сотрудниками отдела «Математические и прикладные проблемы анализа изображений» ФГБУН «Вычислительный центр им. А.А. Дородницына Российской академии наук» (руководитель – к.ф.-м.н. И.Б. Гуревич) и сотрудниками Лаборатории нервных и нейроэндокринных регуляций

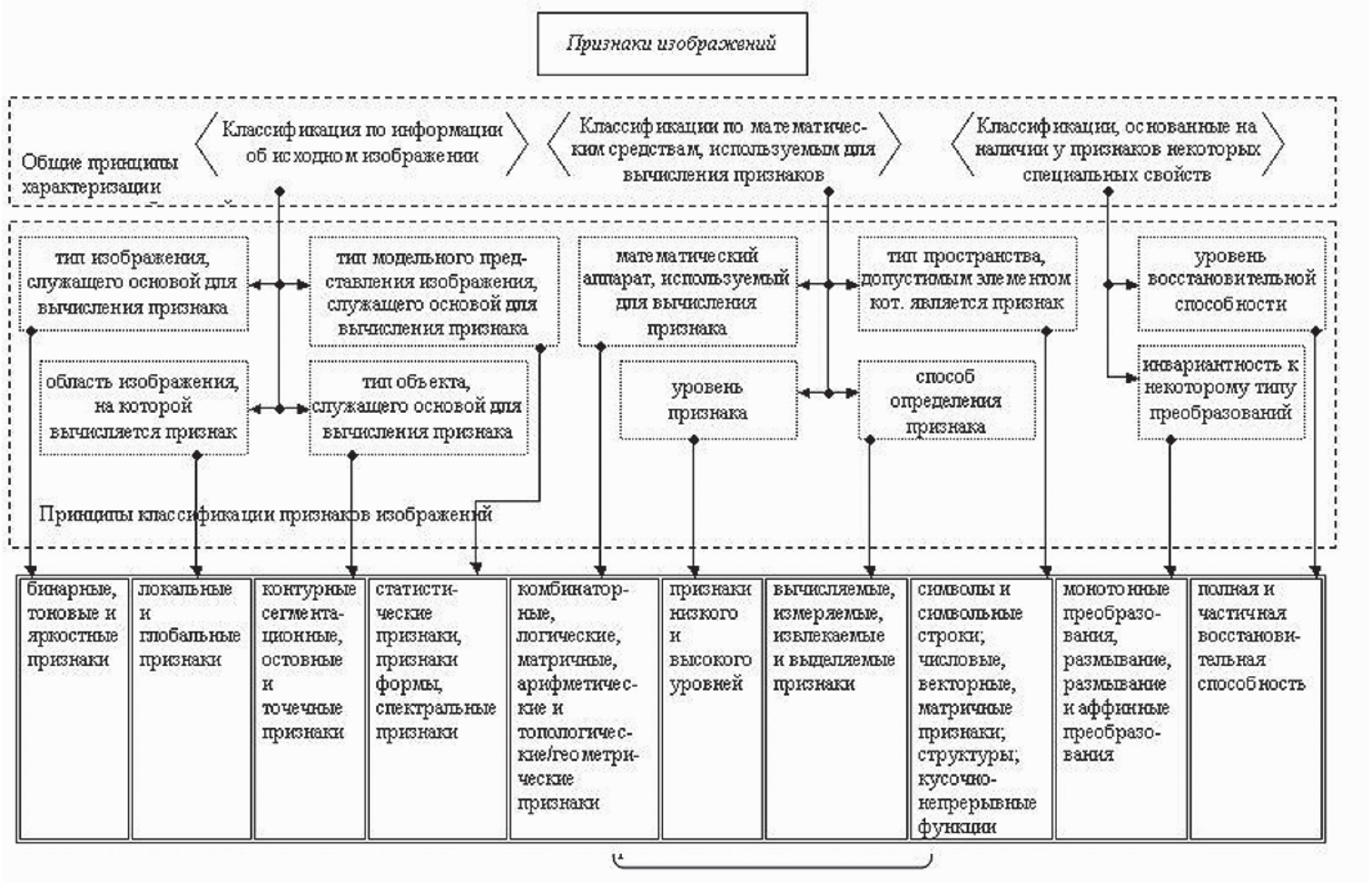


Рис. 4. Признаки изображений

ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук» (руководитель – академик РАН М.В. Угрюмов).

Основные результаты, касающиеся разработанных математических методов, изложены в (Gurevich et al., 2010a–c, 2011a,b, 2012, 2013). На основании разработанных математических методов и базирующихся на них информационных технологиях получены следующие патенты РФ: патент № 118774 (Журавлев и др., 2012) и патент № 2476932 (Гуревич и др., 2013).

4.1. Автоматизация анализа микроскопических изображений нейронов и их отростков

Одной из важнейших задач нейронаук является разработка экспериментальных моделей социально значимых нейродегенеративных заболеваний (НДЗ), в частности, связанных с гибелью дофаминергических (ДА-ергических) нейронов (Albin et al., 1989). Дегенерация последних у человека в нигростриатной системе мозга приводит к развитию БП, а в тубероинфундибулярной системе мозга – к гиперпролактинемии и бесплодию. Создаваемые модели предназначены для разработки новых технологий диагностики и лечения этих заболеваний. Разработка и исследование моделей связаны с проведением массовых скрининговых исследований изменений моторного поведения, уровня секреции пролактина гипофиза, метаболизма дофамина в нигростриатной и тубероинфудибулярной системах мозга и морфологических изменений ДА-ергических нейронов и их аксонов в этих системах.

Оценка соответствующих морфологических показателей является наиболее трудоемкой и дорогостоящей, поскольку в скриннинговом исследовании используется материал от сотен животных. Один высококвалифицированный специалист-морфолог, например, в состоянии осуществить одновременно обработку материала только от двух животных по следующей схеме: а) приготовление 200 замороженных срезов (5 часов) – 150 срезов черной субстанции среднего мозга, где располагаются тела нейронов, и около 50 срезов стриатума – места локализации их аксонов; б) иммуноцитохимическое выявление ДА-ергических тел нейронов и их аксонов по тирозингидроксилазе – ключевому ферменту синтеза дофамина, и приготовление препаратов (5 дней); в) анализ срезов в световом микроскопе, получение изображений тирозингидроксилаза-иммунореактивных нейронов и их аксонов и ввод этих изображений в ЭВМ, обведение вручную терминалей аксонов стриатума и тел нейронов черной субстанции и подсчет 5–6 тысяч нейронов у одного животного (14 дней).Помимо высокой трудоемкости работа требует больших материальных затрат, складывающихся из: зарплаты высококвалифицированного исследователя, амортизации дорогостоящего оборудования и покупки дорогостоящих импортных реактивов, особенно специфических антител, сывороток, китов и флуоресцентных маркеров.

Создание моделей могло бы осуществляться гораздо быстрее и было бы экономически эффективнее при снижении временны́х и материальных затрат на морфо-

логические исследования. Последнее возможно с помощью автоматизации и оптимизации методов обработки и анализа экспериментальных данных.

Результаты морфологических исследований представляются в виде цифровых изображений. Разработка и применение современного математического аппарата для автоматизации извлечения из изображений информации, необходимой для принятия интеллектуальных решений, является одной из критически важных проблем информатики. Новые методы анализа изображений являются необходимой предпосылкой разработки прорывных стандартизированных информационных технологий для автоматического анализа широких классов биомедицинских изображений и создания поддерживающих эти технологии АПК.

Автоматизация анализа микроскопических изображений нейронов (МИН) и их отростков позволяет снизить материальные затраты на порядок, а временны́е затраты на два порядка (Gurevich et al., 2010a,b).

В последние годы разработано большое количество коммерческих систем, предназначенных для обработки, анализа и распознавания информации, представленной в виде изображений, в том числе для автоматизированного анализа биомедицинских изображений, однако специализированных систем или модулей, которые могут быть использованы для выделения нейронов на микроскопических изображениях срезов головного мозга, не так много (Gurevich et al., 2011a,b).

Ниже приведена краткая характеристика некоторых из них.

1) Алгоритм автоматизированного распознавания нейронов «ANRA – Automated Neuron Recognition Algorithm» (Inglis et al., 2008). Метод разработан для поиска местоположения нейронов на цифровых изображениях срезов мозга мыши, окрашенных по методу Ниссля. Для идентификации нейронов используются методы сегментации изображений и методы машинного обучения. Шаги алгоритма включают сегментацию на основе активных контуров (для поиска среди объектов на изображении потенциальных нейронов) и обучение искусственной нейронной сети с использованием результатов сегментации (для разделения «нейронов» и «не-нейронов»).

2) Метод автоматического подсчета клеток «ACCM: Automatic Cell Counting Method» (Benali et al., 2003). Метод разработан для подсчета клеток на срезах головного мозга, окрашенных различными антителами и окрашенных по методу Ниссля. Изображения окрашенных срезов преобразуются в бинарные изображения с помощью метода пороговой обработки. Кластеры пикселей со значением 1, соответствующие телу клетки, выбираются на основе размера. Параметры алгоритма (диапазон интенсивности и размеры кластеров) подбираются в зависимости от использованного метода окрашивания препарата.

3) Набор программных модулей «Neuron Metrics» (Narro et al., 2007). «Neuron Metrics» обеспечивает полуавтоматический количественный анализ двумерных изображений культивированных нейронов, окрашенных флуоресцентными маркерами. Предложенный подход основан на геометрических признаках и позволяет оценить число ветвей сложных древовидных структур с большим числом контактирующих между собой аксонов. Алгоритм вычисляет общую длину аксона, ко-

личество ветвей, индекс полярности (меру полярности нейрона) и другие важные параметры, позволяющие получить представление о размере и форме аксонов, что важно при оценке функционирования нейронов. Полученные числовые данные записываются в отдельный текстовый файл и могут быть использованы другими приложениями для дальнейшего анализа.

Помимо вышеперечисленных программных средств существуют и другие системы и библиотеки алгоритмов, которые могут быть использованы для автоматизации решения задач, возникающих при работе с микроскопическими изображениями окрашенных срезов мозга, но они, как правило, либо являются коммерческими и довольного дорогими, либо являются системами широкого назначения (например «The ImageJ» и «The eXtensible Imaging Platform») и требуют наличия у пользователя большого опыта и навыков в области обработки, анализа и распознавания изображений, а также знаний по разработке программного обеспечения.

Обнаружение и выделение нейронов на двухмерных микроскопических изображениях срезов мозга усложняется следующими факторами (Inglis et al., 2008):а) помимо нейронов на МИН могут присутствовать объекты, которые нейронами не являются (частички грязи, погрешности окрашивания, складки ткани, кровеносные сосуды и другие артефакты); б) нейроны на МИН могут заметно отличаться друг от друга как по размеру, так и по форме; в) нейроны могут быть повреждены в процессе подготовки срезов, что влияет на их форму и как следствие – приводит к большому числу разнотипных клеток на срезе; г) нейроны могут «слипаться» или в толще среза накладываться друг на друга.

В целом приходится согласиться с тем, что понятие «нейрон как визуальный объект» четко не сформулировано, и отсутствует универсальный перечень контекстных, логических, геометрических, качественных и количественных условий и характеристик, позволяющих стандартизировать описание/определение этого визуального объекта.

Как правило, процесс обнаружения и выделения нейронов на гистологических микроскопических изображениях включает следующие основные этапы: предварительная обработка, сегментация и классификация. Необходимость в предварительной обработке МИН вызвана наличием шума, низким разрешением МИН и неоднородностью контраста, связанной с погрешностями при окрашивании срезов. Для улучшения качества МИН обычно используют стандартные операции обработки изображений – сглаживание, обратную свертку, морфологическую фильтрацию и некоторые другие (Sciarabba et al., 2009; Meijering, 2010).

В опубликованных работах, посвященных автоматическому или полуавтоматическому выделению нейронов на МИН, для сегментации, в основном, используются алгоритмы, основанные на пороговой обработке (например: Benali et al., 2003; Masseroli et al., 1993), морфологических операциях (например: Dias et al., 1998), модели Поттса (например: Peng et al., 2003), методе водоразделов (Wang et al., 2006) или активных контурах (Fok et al., 1996; Inglis et al., 2008). Последующая классификация проводится, например, с помощью байессовских процедур, анализа главных компонент или методов машинного обучения (Alavi et al., 2009).

Важным этапом анализа МИН срезов мозга является морфологическая характеризация выделенных нейронов. В последние годы определен широкий спектр специфических морфологических параметров для эффективной математической характеризации морфологии нейронов, в том числе их ядер и отростков (Meijering, 2010).

Разработанный авторами главы математический аппарат для анализа МИН основан на совместном использовании методов математической теории анализа изображений и математической теории распознавания образов, математической морфологии, дескриптивных алгебр изображений, теории информации и методов математической статистики. Разработанные методы позволяют эффективно находить и выделять информативные объекты на микроскопических изображениях срезов мозга при задании ограничений на форму, размер, топологию и характеристики гладкости границ объектов (Gurevich et al., 2010a,b).

Теоретическим фундаментом для разработки методов анализа МИН являлся дескриптивный подход к анализу и пониманию изображений И.Б. Гуревича (Gurevich, 1991). В соответствии с его концепцией, математические методы представляются в виде специализированных алгоритмических схем. Такие схемы включают основные этапы извлечения информации из изображений: 1) предварительную обработку (улучшение качества изображений, удаление несущественных деталей и фрагментов, статистическую и логическую фильтрацию); 2) анализ изображений (обнаружение объектов и выделение их контуров, сегментацию, выбор и выделение признаков, описывающих состав и содержание изображения, поиск, выделение и построение отдельных объектов, отображающих специфику анализируемых изображений и др.); 3) построение описания объектов, представленных на анализируемых изображениях; 4) классификацию изображений и объектов, на них представленных; 5) распознавание.

Методы специализированы и экспериментально исследованы для решения задачи выделения контуров объектов и подсчета их морфофункциональных характеристик: 1) терминалей аксонов ДА-ергических нейронов в области стриатума; 2) тел ДА-ергических нейронов в области компактной части черной субстанции (КЧС); 3) тел ДА-ергических нейронов в области аркуатного ядра (АЯ).

Поставленные задачи содержательно заключаются в выделении контуров и подсчете морфофункциональных количественных характеристик тел (рис. 5а, б) и их отростков (рис. 5в, г) ДА-ергических нейронов в ЧС при моделировании БП и в АЯ при моделировании гиперпролактенемии (экспериментальные животные из опытной группы подвергались воздействию нейротоксина, а контрольные – NaCl) (Козина и др, 2010; Пронина и др., 2010; Ugrumov et al., 2011). Проводились исследования на изображениях срезов головного мозга здоровых животных и животных с патологией (см. рис. 5)

В качестве источника экспериментальных данных использованы цифровые микроскопические изображения ДА-ергических нейронов, волокон и терминалей аксонов срезов головного мозга от контрольных и опытных животных (разрешение 0,0117 мкм^2/пиксел^2). Изображения были получены в Лаборатории нервных и нейроэндокринных регуляций регуляций ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук».

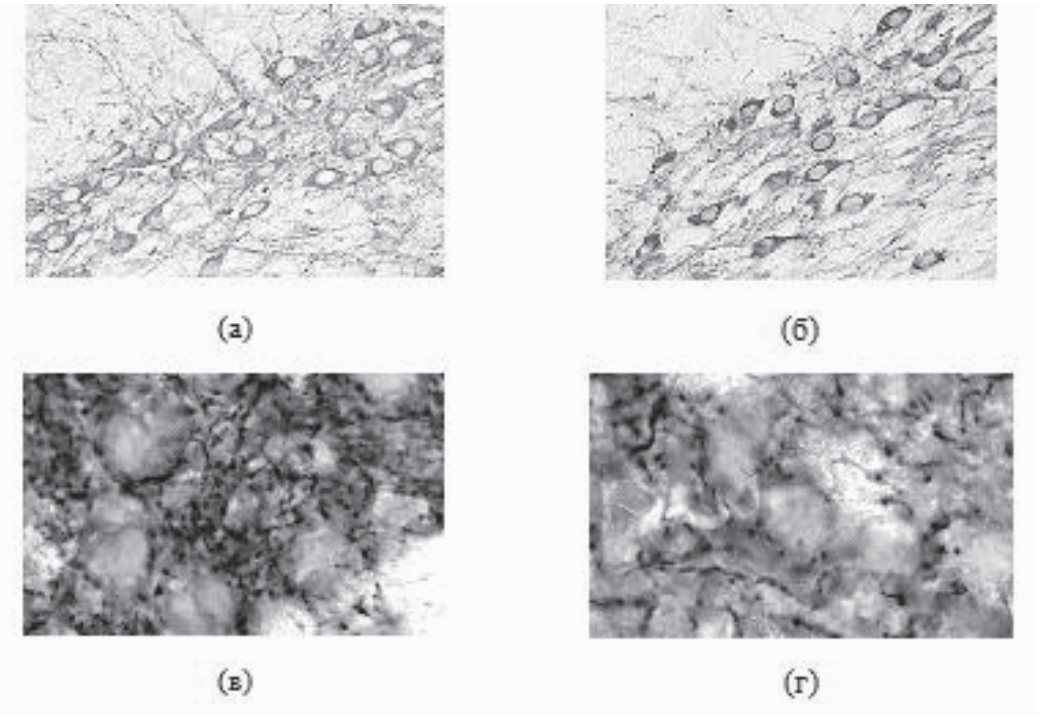


Рис. 5. Тела ДА-ергических нейронов в ЧС норме (а) и при патологии (б) – при моделировании БП у мышей, терминали их аксонов в стриатуме в норме (в) и при патологии (г)

Терминали аксонов ДА-ергических нейронов выявляются на серийных срезах стриатума толщиной 12 мкм. Тела ДА-ергических нейронов выявляются на серийных срезах толщиной 20 мкм, в областях КЧС и АЯ.

Терминали аксонов являются мелкими округлыми объектами с площадью от 0,6 мкм^2 до 3 мкм^2. Форма терминалей аксонов может быть овальной, округлой, вытянутой или неправильной. На представленных негативных тоновых изображениях уровень яркости терминалей аксонов меньше уровня яркости фона.

Существенной характеристикой модели БП является количество терминалей ДА-ергических аксонов, иннервирующих стриатум при использовании различных схем введения нейротоксина – МФТП (доза, количество инъекций, интервалы между инъекциями). Она позволяет оценить степень дегенерации нейронов под воздействием нейротоксина. Степень дегенерации определяется как разница между числом терминалей ДА-ергических аксонов в контроле и опыте. Предполагается также, что терминали ДА-ергические аксоны, сохранившиеся после воздействия нейротоксина и гибели части нейронов, должны обладать повышенной функциональной активностью, направленной на компенсацию возникшего при этом дефицита ДА (Хакимова и др., 2010, 2011а,б; Kozina et al., 2014). Одним из показателей повышенной общей функциональной активности клеток и их отростков, в частности нейронов и их аксонов, может являться увеличение их размера. Специфическим

показателем функциональной активности ДА-ергических нейронов может служить увеличение содержания в них тирозингидроксилазы – основного фермента синтеза ДА (Kozina et al., 2014).

ДА-ергические нейроны в КЧС (рис. 6а) представляют собой темные округлые клетки со светлым ядром. Форма тел ДА-ергических нейронов может быть достаточно произвольной, однако в большинстве случаев наблюдается выпуклость сомы, окружающей ядро. Средний диаметр тел ДА-ергических нейронов находится в диапазоне 20,4±0,5 мкм. Ядра имеют овальную форму: размер минимального диаметра 6,3±0,3 мкм, размер максимального диаметра 9,3±0,3 мкм. Относительный размер тела (сомы) и ядра сильно варьируется (может наблюдаться как очень тонкая оболочка вокруг ядра, так и относительно маленькое ядро по сравнению с площадью сомы). МИН содержат большое количество волокон вокруг клетки, что может маскировать ее, создавая интенсивный фон вокруг нейрона.

Помимо перечисленных в предыдущем разделе факторов, затрудняющих обработку МИН, следует иметь в виду, что: а) МИН содержат участки мозга с различным количественным распределением нейронов на единицу площади; б) микроскопические изображения различных срезов мозга от разных животных сильно различаются по контрасту и яркости.

Известно, что ДА-ергические нейроны в области КЧС являются ключевым звеном регуляции моторного поведения: прогрессирующая дегенерация этих нейронов приводит к развитию БП.

ДА-ергические нейроны в области АЯ (рис. 6б) головного мозга экспериментальных животных визуально не отличаются от нейронов в области КЧС. Нейроны, расположенные на изображениях АЯ, могут не иметь видимых ядер. Линейные размеры нейронов, расположенных на срезах АЯ, такие же, как и в случае с КЧС. Среднее количество нейронов на срезах АЯ в несколько раз меньше, чем в КЧС. Соответственно расположены нейроны более разрозненно друг относительно друга, что практически исключает случаи их взаимного соприкосновения.

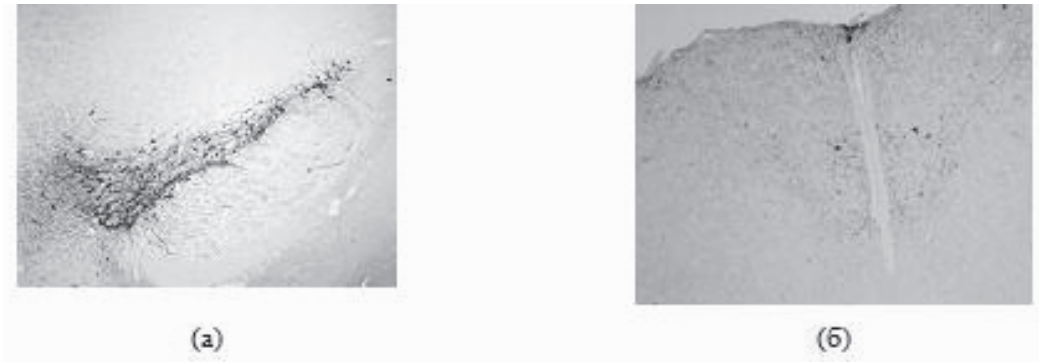


Рис. 6. Тела ДА-ергических нейронов. а – КЧС; б – АЯ

4.2. Математический метод извлечения терминалей аксонов ДА-ергических нейронов в области стриатума срезов головного мозга мышей

Предлагаемый метод предназначен для выделения множества мелких информативных протяженных объектов на изображениях фронтальных срезов стриатума и подсчета их характеристик. Результатом работы метода является двоичное изображение контуров выделенных объектов и список значений характеристик, подсчитанных для каждого выделенного объекта.

Разработанная алгоритмическая схема состоит из следующих этапов: (1) предобработка: (1.1) «открытие» изображения с помощью реконструкции, (1.2) преобразование «дно шляпы» с помощью двойственной реконструкции, (1.3) «закрытие» изображения с помощью двойственной реконструкции, (1.4) преобразование, устраняющее h-максимумы изображения; (2) анализ изображений: (2.1) выделение внутренних и внешних маркеров объектов, (2.2) преобразование морфологического градиента по найденным маркерам с помощью двойственной реконструкции, (2.3) выделение объектов с помощью алгоритма сегментации по водоразделам; (3) построение описания объектов, представленных на анализируемых изображениях: (3.1) построение признакового описания объектов (были использованы 25 морфометрических, денситометрических и текстурных признаков), (3.2) выбор признаков; (4) классификация: (4.1) кластеризация объектов, (4.2) интерпретация результатов.

Этапы предобработки и анализа изображений схемы основаны на следующих операциях математической морфологии: «открытие» (Soille, 2004), тоновая реконструкция (Gonzalez, Woods, 2002), «закрытие» (Soille, 2004), преобразование «дно шляпы» (Vincent, 1993), морфологический градиент (Vincent, 1993) и преобразование водораздела (Vincent, Soille, 1991; Wu, 2008). Применение этих шагов к исходным изображениям позволяет сгладить неоднородный сложный фон, выбрать маленькие объекты на изображениях, в зависимости от заданных размеров и величины тона, удалить несфокусированные объекты, разделить близко находящиеся объекты.

Ниже шаги метода описываются по следующей схеме: (1) роль данного преобразования при решении поставленной задачи; (2) иллюстративный материал, позволяющий оценить результат. Общие характеристики применяемых преобразований или алгоритмов, а также их математическое содержание и графики функций яркости пикселей представлены в работе (Gurevich et al., 2010a,b).

Этап 1. Предобработка изображений.

Все шаги первого этапа введены для того, чтобы избежать сегментации лишних объектов во время применения преобразования водораздела к изображению математического градиента.

Шаг 1.1. Открытие изображения с помощью реконструкции.

На шаге 1.1 метода на исходном изображении удаляются всплески яркости, соответствующие фону. В общем случае процедура открытия с помощью реконструкции используется для устранения узких всплесков яркости при сохранении среднего тонового фона и широких областей изменения яркости неизменными.

Понятия узости и широты зависят от используемого структурирующего элемента. Отличие данного преобразования от обычного открытия состоит в том, что дилатация изображения, подвергнутого эрозии, с тем же структурирующем элементом только частично восстанавливает значения яркости областей, которые не полностью сглажены эрозией, в то время как применение реконструкции позволяет избежать потери нужной информации. На рис. 7а представлены результаты выполнения данного преобразования.

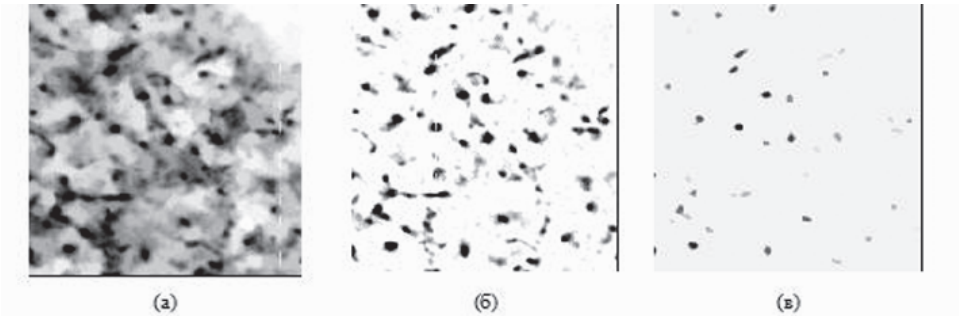


Рис. 7. Этап 1. Предобработка МИН: а – открытие исходного изображения с помощью реконструкции; б – преобразование «дно шляпы» с помощью двойственной реконструкции и закрытие с помощью двойственной реконструкции; в – преобразование, устраняющее h-максимумы изображения

Этот шаг необходим для того, чтобы сократить число фоновых областей, в которых достигаются локальные минимумы, в дальнейшем используемые в качестве маркеров объектов.

Шаг 1.2. Преобразование «дно шляпы» с помощью двойственной реконструкции.

Основной целью данного шага является сглаживание неоднородного сложного фона изображения.

Данное преобразование используется для удаления неоднородного сложного фона на изображениях объектов, значения яркости которых меньше значений яркости фона. Суть данного преобразования в том, что при правильном подборе структурирующего элемента (такого, что каждый объект целиком помещается в структурирующем элементе) закрытие с помощью двойственной реконструкции позволяет пометить узкие «углубления» яркости, при этом не помечая широкие, что дает хорошее приближение фона. После вычитания из закрытого изображения исходного фон получается более однородным. Применение двойственной реконструкции обусловлено необходимостью сохранять значения яркости внутри объектов, которые не полностью сглажены дилатацией.

При этом преобразовании внутренняя структура терминалей не изменяется. Достигается это за счет применения двойственной реконструкции и за счет того, что используемый структурирующий элемент вмещает в себя любую терминаль.

Шаг 1.3. Закрытие изображения с помощью двойственной реконструкции.

Этот шаг метода предназначен для сглаживания неоднородных областей изменения яркости внутри терминалей. В общем случае процедура закрытия с помо-

щью двойственной реконструкции используется для удаления узких углублений яркости при сохранении среднего полутонового фона и широких областей изменения яркости неизменными. Отличие данного преобразования от обычного закрытия состоит в том, что эрозия изображения, подвергнутого дилатации, по тому же структурирующему элементу только частично восстанавливает значения яркости областей, которые не полностью сглажены дилатацией. На рис. 7б представлены результаты выполнения шагов 1.2 и 1.3.

Данный шаг необходим для того, чтобы маркеры объектов как можно точнее соответствовали терминалям. В ином случае, так как в любой терминали изначально присутствует множество локальных минимумов яркости, процедура извлечения маркеров не давала бы желаемых результатов.

Шаг 1.4. Преобразование, устраняющее h-максимумы изображения.

Данный шаг соответствует исключению плохо сфокусированных объектов из рассмотрения. На срезе головного мозга, который имеет толщину 12 мкм, терминали располагаются слоями. При фотографировании среза только одна плоскость среза попадает в фокус микроскопа, поэтому одни терминали оказываются ярче других. Кроме того, возможно неравномерное прокрашивание терминалей, что также влечет различия в их яркости. Необходимо определить, какие объекты находятся ближе к фокусу, а какие – дальше.

Чем ближе к фокусу микроскопа находится объект, тем больше разность между максимальным и минимальным значениями яркости объекта. Так как в результате предыдущих преобразований максимумы яркости всех объектов выравниваются, то для определения степени близости к фокусу можно использовать минимумы яркости объектов, или, что то же самое, значения яркости региональных минимумов изображения. Для автоматизации процедуры сегментации объекты были разделены по яркости на два кластера. Начальные значения для центров кластеров полагались равными минимальному и максимальному значениям яркости изображения, полученного на предыдущем шаге. Результаты применения шага 1.4 представлены на рис. 7в.

Этап 2. Анализ изображений.

На втором этапе применялся широко известный подход сегментации по водоразделам с использованием маркеров.

Шаг 2.1. Выделение внутренних и внешних маркеров объектов.

Применение алгоритма сегментации по водоразделам обычно приводит к избыточной сегментации, вызванной шумом или другими локальными неоднородностями на градиентном изображении. Подход, применяемый для управления избыточной сегментацией, основан на идее маркеров. Маркер представляет собой связную компоненту, принадлежащую изображению. Различают внутренние маркеры, относящиеся к объектам, и внешние маркеры, соответствующие фону изображения. Обычно внешние маркеры определяют таким образом, чтобы любой внешний маркер окружал ровно один внутренний маркер. Затем эти маркеры используются для преобразования градиентного изображения. В результате применения алгоритма сегментации по водоразделам к преобразованному градиентному изображению выделяются границы только тех объектов, которые были помечены внутренними маркерами.

Внутренние маркеры вычисляются как региональные минимумы изображения, полученного на предыдущем шаге. Внешние маркеры вычисляются с помощью изображения, полученного преобразованием расстояния из двоичного изображения внутренних маркеров. При данном преобразовании каждой точке изображения присваивается значение, равное расстоянию до ближайшего не-фонового пиксела. Затем к полученному изображению применяется процедура сегментации по водоразделам. Получается, что линиям водоразделов соответствуют пикселы, находящиеся на максимальном удалении от ближайших внутренних маркеров. Внутренние и внешние маркеры изображены на рис. 8а.

Шаг 2.2. Преобразование морфологического градиента по найденным маркерам.

Морфологический градиент, представленный на рис. 8б, получается вычитанием из изображения, полученного после шага «закрытие изображения с помощью двойственной реконструкции» и подвергнутого дилатации того же изображения, подвергнутого эрозии. На рис. 8в представлено преобразование градиента по найденным маркерам.

Шаг 2.3. Выделение объектов с помощью алгоритма сегментации по водоразделам.

Понятие «водораздела» основано на представлении изображения в виде трехмерной поверхности. В такой «топографической» интерпретации рассматриваются точки трех видов: (1) точки локального минимума; (2) точки, находящиеся на склоне, т.е. те точки, с которых вода скатывается в один и тот же локальный минимум; (3) точки, находящиеся на гребне или пике, т.е. те точки, с которых вода с равной вероятностью скатывается более чем в один локальный минимум.

Применительно к конкретному локальному минимуму, набор точек, удовлетворяющих условию 2, называется «бассейном» (или «водосбором») этого минимума. Множества точек, удовлетворяющих условию 3, образуют линии гребней на поверхности рельефа и называются «линиями водоразделов».

На практике метод сегментации по водоразделам чаще всего применяется к градиенту изображения. В этом случае локальные минимумы бассейнов хорошо

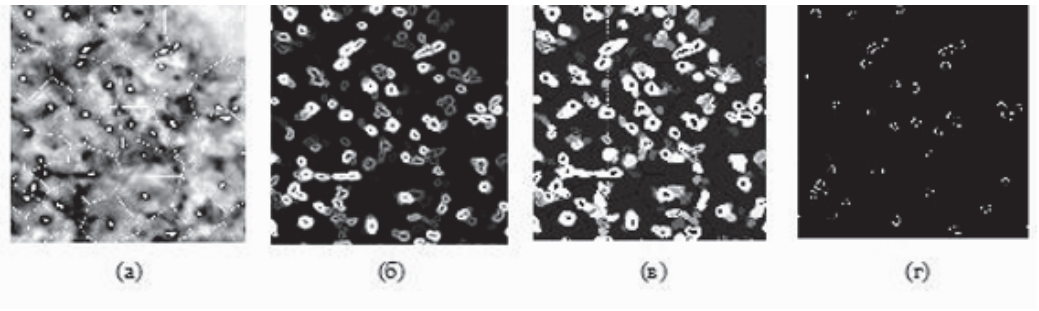


Рис. 8. Этап 2. Анализ изображений: а – внешние и внутренние маркеры объектов; б – изображение морфологического градиента; в – изображение, полученное в результате преобразования морфологического градиента по найденным маркерам; г – линии «водоразделов» – контуры выделенных объектов

согласуются с малыми значениями градиента, что обычно соответствует объектам, тогда как линии водоразделов, соответствующие пикселам изображения градиента с большими значениями, приближают границу объектов. Далее к преобразованному градиенту применяется процедура сегментации по водоразделам, в результате чего получаются границы объектов. На рис. 8г изображены линии «водоразделов».

На этапе 3 были выбраны информативные признаки для описания объектов. Интерпретация этих признаков экспертами может открыть новые принципы построения модели БП.

На этапе 4 объекты были разделены на несколько групп. Характеристики получившихся кластеров были переданы экспертам-биологам для дальнейшего детального анализа.

Разработанный метод программно реализован и экспериментально исследован в ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук» для автоматизации наполнения и исследования моделей БП экспериментальными данными. Большинство алгоритмов, реализующих разработанный метод, имеют полиномиальную сложность, что доказывает их эффективность. Стоит также отметить, что алгоритмы, реализующие операции математической морфологии, допускают эффективное распараллеливание.

Точность полученных результатов оценивается путем проверки гипотез о совпадении распределений (нулевая гипотеза) характеристик терминалей при автоматическом выделении и при выделении вручную по критерию Колмогорова-Смирнова (усредненные значения характеристик объектов, выделенных автоматически и вручную, приведены в табл. 1).

Для сравнения результатов автоматического и ручного выделения терминалей случайно выбранные прямоугольные фрагменты исходных изображений были обработаны экспертами в области БП и с помощью предложенного метода. Таким образом, точность разработанного метода является не меньшей при ручном выделении объектов. По оценке экспертов, доля объектов, выделенных правильно при автоматической обработке, составила 93%.

Исходное изображение с помеченными на нем границами терминалей, выделенных с помощью разработанного метода, представлено на рис. 9а. На рис. 9б приведено то же изображение, но с контурами объектов, выделенных вручную.

Таблица 1

Сравнение характеристик объектов, выделенных автоматически и вручную

Статистические характеристики	Способ выделения	Площадь		Средняя яркость		Кол-во	
		опыт	контр.	опыт	контр.	опыт	контр.
Математическое ожидание	автомат.	1,37	1,30	96,23	82,93	15,2	36,4
	вручную	1,56	1,52	95,79	83,60	13,6	34,6
Среднеквадратичное отклонение	автомат.	0,69	0,52	9,93	10,77	3,1	3,8
	вручную	0,57	0,70	10,99	11,57	3,8	4,0
Нулевая гипотеза	–	отвергнута	отвергнута	принята	принята	принята	принята

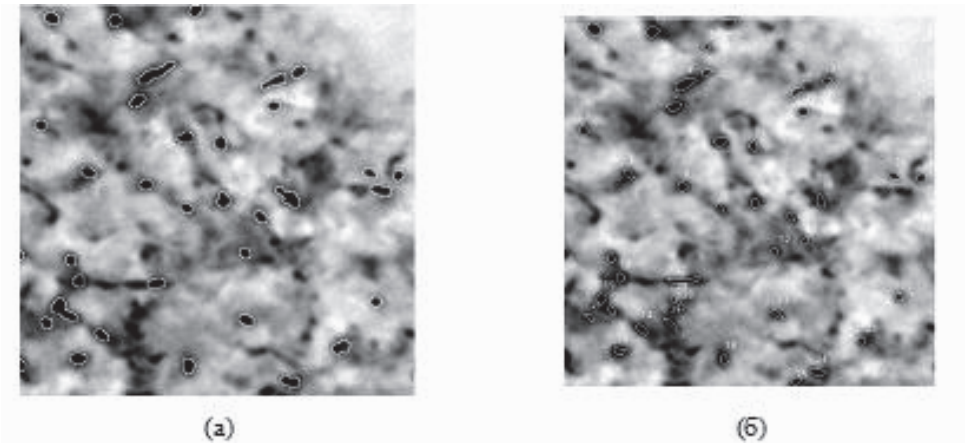


Рис. 9. Выделение объектов: а – автоматический режим; б – выделение вручную

Программная реализация метода выделения терминалей обеспечивает следующие возможности: (1) автоматическую сегментацию всех исследуемых объектов на изображении среза; (2) определение морфологических характеристик помеченных объектов (диаметр, площадь, фактор формы (степень округлости)); (3) определение денситометрических характеристик помеченных объектов (определение оптической плотности терминалей); (4) сохранение всех результатов работы в базе данных; (5) возможность обработки изображений, разделенных на задаваемые группы; (6) автоматическая группировка исходных изображений различными способами (по всем парам экспериментальных животных, по различным областям мозга (дорсальной и вентральной), по направлению срезов (ростро-каудальному)); (7) получение статистических характеристик вычисленных оценок (математическое ожидание, среднеквадратическое отклонение, стандартная ошибка) и проверка гипотез о достоверности различий опытной и контрольной групп на заданном наборе изображений (Т-критерий Стьюдента: статистика, достигаемый уровень значимости, принятая гипотеза).

Применение разработанного ПО позволяет существенно ускорить исследование моделей БП. По оценкам самих экспертов — приблизительно в 200 раз.

Результаты экспериментов показали: (1) существенное уменьшение количества терминалей ДА-ергических аксонов в опыте по сравнению с количеством терминалей в контроле; (2) изменение функциональной активности ДА-ергических терминалей по оптической плотности, которая коррелирует с содержанием тирозингидроксилазы, после воздействия нейротоксина.

С помощью разработанного метода были также проанализированы полученные после воздействия нейротоксина срезы аркуатного ядра гипоталамуса мышей, содержащие ДА-ергические терминали. В результате обработки 2000 изображений впервые получены данные о воздействии нейротоксина на тубероинфундибулярную систему мозга мышей, позволяющие оценить функциональное состояние этой системы.

4.3. Математический метод извлечения тел нейронов в областях черной субстанции и аркуатного ядра срезов головного мозга грызунов

Разработанный метод предназначен для выделения множества мелких информативных протяженных объектов с хорошо различимым по яркости включением овальной формы на микроскопических изображениях фронтальных срезов КЧС и АЯ и подсчета их морфометрических характеристик. Результатом является двоичное изображение контуров выделенных объектов и их включений и список значений характеристик, вычисленных для каждого выделенного объекта. Метод основан на совместном использовании процедур математической морфологии, сегментации и классификации микроскопических изображений.

Основной особенностью метода является то, что после предварительной обработки изображений проводится итерационный анализ микроскопических изображений с целью выделения различных классов объектов, включающий 5 процедур: 1) объекты, не являющиеся нейронами, исключаются на этапе применения классификатора; 2) после классификации выделяется специальный класс объектов – «слипшиеся нейроны»; их анализ сводится к построению границы между двумя нейронами по центру области из соприкосновения; 3) проведение сегментации обеспечивает выделение «хороших» («правильной формы») нейронов; 4) анализ нейронов с тонкой сомой, у которых частично «стерта» граница и ядро соприкасается с фоном; 5) удаление отростков нейронов.

Комбинированный метод содержит следующие основные этапы: (1) предварительная обработка МИН: (1.1) фильтрация МИН нерезкой маской, (1.2) нормализация МИН, (1.3) морфологическое закрытие с помощью реконструкции, (1.4) бинаризация МИН; (2) анализ МИН: 2.1) сегментация МИН, (2.2) классификация выделенных объектов, (2.3) выделение «нейронов», (2.4) прослеживание границ «нейронов», (2.5) отсечение отростков «нейронов», 2.6) построение границ ядер выделенных «нейронов»; (3) морфологическая характеризация нейронов.

Для АЯ алгоритмическая схема метода аналогична построенной для КЧС. Отличия заключаются лишь в значении параметров для пункта 1.4 и способе обучения алгоритма классификации для пункта 2.2.

Алгоритмическая схема, реализующая разработанный метод выделения и идентификации объектов, включает следующие этапы.

Этап 1. Предварительная обработка МИН.

Шаг 1.1. Фильтрация МИН нерезкой маской.

На данном шаге происходит увеличение общей резкости МИН, что позволяет повысить точность разделения близко расположенных нейронов на дальнейших этапах. Нерезкое маскирование усиливает локальный контраст изображения на тех участках, где изначально присутствовали резкие изменения градаций цвета, что и помогает сохранять границы между нейронами. На рис. 10а представлено изображение, полученное после применения к исходному изображению фильтра нерезкой маски.

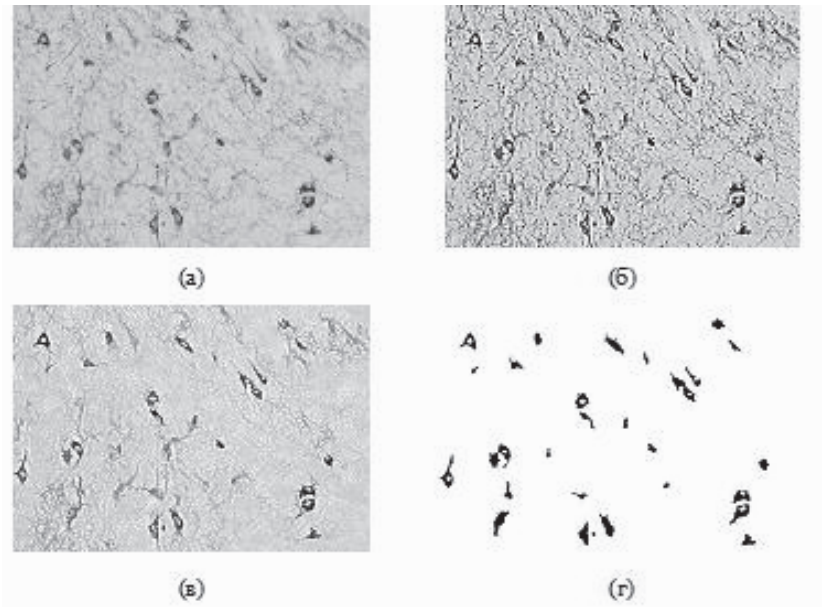


Рис. 10. Этап 1. Предобработка МИН. а – результат применения к МИН фильтра нерезкой маски; б – более «резкое» тоновое МИН; в – результат подавления темных шумовых объектов, размеры которых меньше размеров нейронов; г – бинарное МИН, содержащее информацию о контурах нейронов и шумовых объектов, которые в дальнейшем подаются на вход классификатору

Шаг 1.2. Нормализация.

На данном шаге происходит переход к тоновому представлению МИН для нормализации различия в окраске препаратов (рис. 10б).

Шаг 1.3. Фильтрация МИН с применением морфологического закрытия при помощи реконструкции.

В результате данного шага метода с тонового МИН исчезают мелкие шумовые объекты, в то время как массивные объекты, в том числе нейроны, не претерпевают существенных изменений в своей форме. Модифицированное изображение представлено на рис. 10в.

Применение морфологического фильтра обусловлено тем, что на исходных МИН присутствуют шумовые объекты, которые, с одной стороны, не принадлежат к объектам фона, с другой – не являются целевыми объектами. Шум на изображении образуется за счет частей нейронов (часть оболочки нейрона), которые полностью не попали на срез, либо за счет попадания на срез терминалей. Наличие шумовых объектов на изображении искажает результаты классификации, кроме того, они могут повлиять на форму выделенных объектов в случае наложения.

Для морфологической обработки изображений был выбран фильтр «закрытие при помощи реконструкции», т.к. после применения этого фильтра сохраняются границы объектов, прошедших фильтрацию.

После морфологической фильтрации на тоновом изображении остаются крупные объекты переднего плана, четко отделимые от фона, однако среди оставших-

ся объектов могут присутствовать также крупные шумовые объекты. В результате применения фильтра мелкие детали становятся более светлыми за счёт своих размеров, тогда как крупные объекты, такие как целые нейроны с ядром, напротив, становятся более темными.

Шаг 1.4. Бинаризация.

На данном шаге метода осуществляется переход от тонового МИН к бинарному для последующей сегментации интересуемых объектов. Бинарное изображение представлено на рис. 10г. Бинаризация изображения осуществляется при помощи алгоритма пороговой обработки с адаптивным порогом. Адаптивный порог подбирается по методу Н. Отсу (Otsu, 1975).

Анализ срезов АЯ показал, что изображения в АЯ более контрастные и разница в яркостях между фоном и нейронами более существенная, чем у изображений в КЧС. В связи с этим порог, вычисленный по методу Отсу, умножается на некоторую нормирующую константу. Значение константы (0,74) было найдено экспериментально по результатам бинаризации изображений из обучающей выборки.

Этап 2. Анализ МИН.

Шаг 2.1. Сегментация МИН.

На данном шаге происходит выделение похожих на нейроны объектов из выделенных связных компонент бинарного изображения. После проведения сегментации МИН некоторые нейроны, находящиеся очень близко друг к другу на исходном изображении, могут «слипнуться» так, что граница между ними не прослеживается, поэтому в одной связной компоненте может находиться несколько нейронов, что будет учтено позже на стадии классификации и на стадии выделения границ объектов.

Проводится исключение объектов по критериям формы и размеров нейронов, а именно – происходит отсечение лишних объектов по размерам: а) сверху с очень высоким порогом, чтобы убрать большие области, заведомо не являющиеся нейронами, но при этом оставить фрагменты, соответствующие «слипшимся» нейронам; б) снизу с маленьким нижним порогом, чтобы убрать заведомый шум. Далее выбираются области с выделенными объектами, в которых для последующей классификации строятся минимальные квадраты, описывающие объекты.

Шаг 2.2. Классификация выделенных объектов на два класса – «нейроны» и «прочие объекты».

Задача распознавания нейронов решалась с помощью линейного классификатора, основанного на вычислении признаков гистограмм ориентированных градиентов (HOG-признаки). Это обусловлено следующими причинами: во-первых, скорость работы данного типа классификатора является довольно высокой для задачи распознавания нейронов; во-вторых, при тестировании HOG-классификатор показал лучшие результаты по сравнению с другими известными классификаторами.

Параметры алгоритма классификации подбираются экспериментально по качеству классификации на обучающей выборке. Для обучения классификатора выбран метод опорных векторов (SVM) с линейным ядром. Размер скользящего окна – 32×32 пикселов (исходя из того, что в него должен помещаться любой нейрон обучающей выборки).

Получение признакового описания нейронов из обучающей выборки проводится следующим образом: 1) квадратная обасть приводится к размеру 32×32 пикселей и разбивается на ячейки 8×8 пикселей; 2) каждая ячейка описывается гистограммой направлений градиентов (квантованным по 8 направлениям); 3) ячейки объединяются в блоки размера 2×2 пиксела с перекрытием; 4) производится нормализация гистограммы направлений в каждом из блоков; 5) значения частот гистограмм по каждой из ячеек и по всем блокам записываются в общий вектор, характеризующий данную область.

Классификатор применяется при разных разрешениях к квадратным фрагментам МИН, которые содержат связные области, выделенные на предыдущем шаге. Данный подход позволяет определить наличие как одного, так и нескольких нейронов в одной связной области.

Точность обученного классификатора на тестовой выборке составила: 5% (7% в случае АЯ) – ошибка первого рода (нейроны, отнесенные к классу «прочие объекты»), 15% (20% в случае АЯ) – ошибка второго рода (не-нейроны, идентифицированные как «нейроны»). Точность классификатора может быть улучшена за счет увеличения обучающей выборки и применения техники бутстрэп-оценок для выбора фоновых объектов.

На рис. 11 представлены МИН с отмеченными белым цветом контурами выделенных нейронов. Черным обозначены контуры объектов, не попавших в класс нейронов.

Шаг 2.3. Выделение «нейронов».

На данном шаге проводится удаление всех связных компонент в соответствии со списком минимальных квадратов, описывающих «прочие объекты». В реальности обработка одной связной компоненты и подача ее на вход классификатору одновременно (изображение обрабатывается фрагментарно), поэтому если связная компонента не содержит нейроны, то она автоматически убирается из списка связных областей на шаге 2.2. Далее проверяется количество выделенных «нейронов» в каждой связной компоненте.

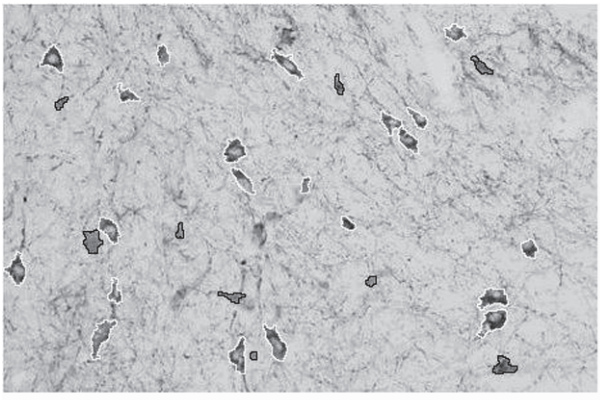


Рис. 11. МИН с отмеченными белым цветом контурами выделенных нейронов. Черным обозначены контуры объектов, не попавших в класс нейронов

Шаг 2.4. Прослеживание границ нейронов.

При наличии в одной связной компоненте нескольких нейронов проводится разделение «слипшихся» нейронов. Связная компонента, предварительно не распознанная как нейрон и подходящая по размерам, проверяется на наличие областей белого цвета, полностью входящих в нее. При наличии нескольких областей проводятся серединные перпендикуляры к линии, соединяющей их центры. Эти перпендикуляры будут являться частью границы новых нейронов.

После того как граница нового кандидата в нейроны выделена, строится описывающий его минимальный квадрат и запускается классификатор, который определяет, принадлежит вновь выделенный объект к классу нейронов или нет.

Стоит отметить, что в случае АЯ данная проблема встречается очень редко, т.к. нейроны, расположенные в этой области мозга, более разрозненные по сравнению с нейронами в КЧС. Данный шаг исключается из алгоритмической схемы метода.

На данном шаге также проводится сравнение прослеженной границы связной области и минимальной выпуклой оболочки: при существенном отличии участка выпуклой оболочки от прослеженной границы связной области в качестве границы берется участок выпуклой оболочки; при совпадении или незначительных отличиях в качестве границы берется граница связной области.

Шаг 2.5. Отсечение отростков нейронов.

Отсечение отростков нейронов проводится путем операции открытия при помощи реконструкции с большим радиусом структурирующего элемента. На рис. 12 представлен фрагмент МИН в области КЧС, на котором выделены контуры объектов, отнесенных к классу «нейроны». Результаты выделения нейронов для специальных случаев представлены на рис. 13: 1) «слипшиеся» нейроны (см. рис. 13а); 2) нейроны с отростками (см. рис. 13б); 3) нейроны с нерезкой границей (см. рис. 13в).

Из области, принадлежащей нейронам, заключенной внутри границы, исключаются пикселы, принадлежащие связной области. Оставшиеся пикселы по определению принадлежат ядру.

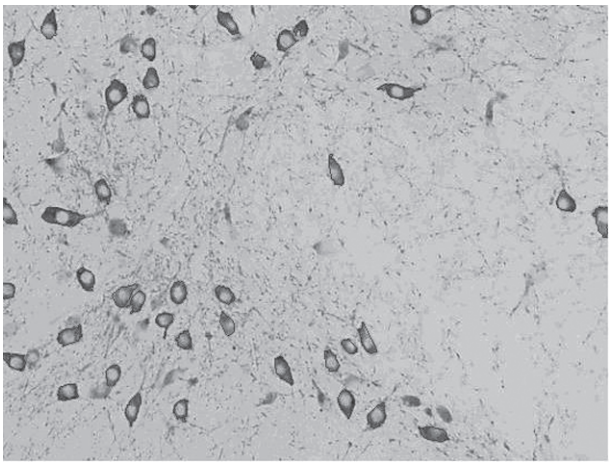


Рис. 12. Контуры выделенных ДА-ергических нейронов в КЧС

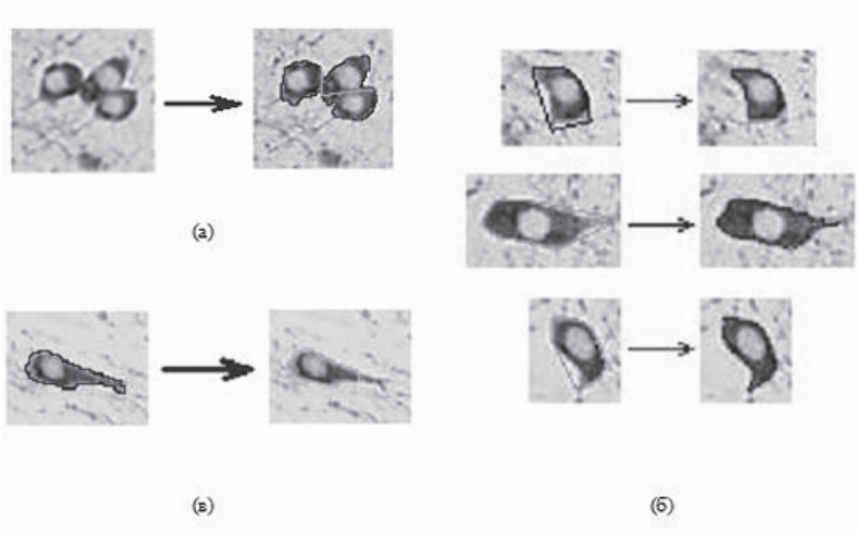


Рис. 13. Разделение «слипшихся» нейронов (а); отсечение отростков нейронов (б); построение минимальной выпуклой оболочки (в)

Этап 3. Морфологическая характеризация нейронов.

На данном этапе проводилось формирование необходимого признакового пространства для характеризации нейронов. Биологи-эксперты включили в признаковое описание нейрона среднюю яркость, периметр, площадь, фактор формы, оптическую плотность, количество.

Разработанный метод анализа МИН обладает сходимостью, устойчивостью к малым вариациям исходных данных, имеет квадратичную вычислительную сложность. Метод программно реализован и экспериментально исследован для автоматизации наполнения и исследования доклинических моделей БП экспериментальными данными в ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова Российской академии наук».

Экспериментальные исследования проводились на 58 срезах головного мозга одного животного. Точность полученных результатов оценивалась путем проверки гипотез о совпадении распределений (нулевая гипотеза) характеристик нейронов при автоматическом выделении и при выделении вручную по критерию Колмогорова–Смирнова.

Точность полученных результатов также оценивалась путем подсчета экспертами процента правильно выделенных объектов после автоматической обработки изображений.

Были проведены следующие эксперименты: 1) сравнение ручного и автоматического выделения нейронов на срезах головного мозга: а) по наличию правильно выделенных нейронов, б) по наличию объектов, выделенных как нейрон, но таковыми не являющимися, в) по количеству нейронов, не выделенных при автоматическом режиме; 2) сравнение ручного и полуавтоматического выделения нейронов; 3) сравнение автоматического и полуавтоматического выделения нейронов.

Полуавтоматическая обработка включала в себя последовательное применение ПО для автоматического выделения нейронов и дальнейшую коррекцию результатов специалистами. Результатами сравнения режимов работы являлись оценки первого и второго рода (оценка первого рода – процент невыделенных нейронов, оценка второго рода – процент выделенных объектов, не являющихся нейронами).

Срезы обрабатывались последовательно один за другим (на первом этапе проводилось ручное выделение нейронов, на втором этапе выполнялось автоматическое выделение, на третьем этапе запускалось автоматическое выделение с последующей корректировкой результатов в полуавтоматическом режиме).

Результаты экспериментов показали отсутствие ошибки 2-го рода. Далее приведен анализ ошибки 1-го рода в трех экспериментах.

В результате сравнения автоматического и полуавтоматического режимов работы ПО было получено, что математическое ожидание разницы в количестве выделенных нейронов в двух режимах равно -8,16. Среднеквадратичное отклонение равно 7,5. Математическое ожидание и среднеквадратичное отклонение – это величины одного порядка, что говорит о сильной рандомизации данных. Это объясняется тем, что представленные изображения имеют большой разброс по яркости и контрасту, и на изображениях встречается шум разной структуры (возникают случаи, когда нейроны полностью сливаются с шумом и становится практически невозможно отделить одно от другого). Средняя ошибка 1-го рода соответственно равна 0,082.

В результате сравнения автоматического и ручного режимов работы выявлено, что средняя ошибка первого рода равна 0,065, что меньше ошибки при сравнении с полуавтоматическим режимом выделения. Это связано с тем, что вручную эксперты также ошибаются и не могут отметить все нейроны из-за большого объема работы, однако при полуавтоматическом режиме им остается выделить нейронов на порядок меньше. Средняя ошибка выделения -6,407. Значение дисперсии на порядок больше, что снова говорит о рандомизации данных.

В результате сравнения ручного и полуавтоматического режимов работы ПО выявлено, что среднее значение отклонения количества выделенных нейронов в двух режимах равно -1,763 и среднеквадратичное отклонение -5,35. Средняя величина ошибки первого рода равна соответственно 0,018. По значениям этих величин можно сказать, что ручной режим выделения нейронов мало отличается от полуавтоматического режима.

Было проведено сравнение времени, затраченного специалистом на обработку одного изображения КЧС головного мозга в ручном, автоматическом и полуавтоматическом режимах работы программы. В качестве эталонных брались изображения, содержащие более 60 нейронов. В ручном режиме среднее время выделения всех нейронов на одном изображении заняло 5,3 минуты, в автоматическом режиме – 10 секунд, в полуавтоматическом – 35 секунд.

Ручной режим обработки занимает существенно больше времени, чем автоматический или полуавтоматический. Время работы эксперта в полуавтоматическом режиме в 3 раза больше работы программы в автоматическом режиме. Ошибка 1-ого рода, равная 0.08299525, при сравнении полуавтоматического и автоматичес-

кого режимов работы превышает заданный биологами порог в 5%, а время полуавтоматического режима работы несущественно больше. Поэтому рекомендовано проводить выделение нейронов в полуавтоматическом режиме.

Точность полученных результатов также оценивалась путем сравнения средних морфофункциональных характеристик при автоматическом и ручном выделении нейронов на случайно выбранных срезах головного мозга (было выбрано 5 срезов головного мозга). Усредненные значения характеристик объектов, выделенных автоматически и вручную, приведены в табл. 2. В ней представлены также значения корреляции между подсчитанными в ручном и автоматическом режимах характеристиками. Результаты подтверждают, что автоматическое выделение приближено к ручному: различия между яркостью и площадью выделяемой области в пределах допустимого, а большее различие между периметрами и фактором формы объектов объясняется тем, что вручную точную границу провести очень сложно.

В ходе проведенных экспериментальных исследований были подтверждены следующие характеристики разработанных алгоритмов: 1) алгоритмы обеспечивают анализ и распознавание изображений нейронов на двухмерных срезах головного мозга экспериментальных животных; 2) автоматизированный анализ изображений нейронов в соответствии со статистической оценкой критерия Колмогорова–Смирнова проводится с точностью, соизмеримой с точностью визуального анализа изображений нейронов, проводимого при изучении болезни Паркинсона без использования средств автоматизации анализа изображений.

Таблица 2

Сравнение характеристик объектов, выделенных автоматически и вручную

Ручной режим выделения				
Изображение	Средняя яркость (0…255)	Площадь ($мм^2$)	Периметр (мм)	Фактор формы
1	149,7	2,355	5,09	-0,06
2	145,9	3,046	6,08	-0,02
3	149,8	2,815	5,77	-0,03
4	146,4	2,756	5,31	-0,02
5	150,0	2,493	5,23	-0,02
Автоматический режим выделения				
1	149,1	2,403	5,42	-0,05
2	145,2	3,166	6,69	-0,03
3	148,1	2,848	5,66	-0,03
4	146,6	2,813	5,11	-0,04
5	148,4	2,508	5,37	-0,03
Корреляция ручного и автоматических режимов				
	0,95	0,99	0,87	0,78

4.4. Программное обеспечение анализа и распознавания изображений нейронов

Авторами главы для автоматизации анализа микроскопических изображений нейронов и их отростков было разработано ПО анализа и распознавания изображений нейронов (ПО АРИН).

Проектирование и разработка архитектуры программы велась в соответствии с общепринятым унифицированным итеративным процессом проектирования UP программной системы, включающим: анализ требований, объектно-ориентированный анализ, проектирование и реализацию разработанных компонентов.

Были выявлены следующие требования к разрабатываемой системе:

1. Алгоритмы автоматического выделения объектов-нейронов должны обеспечивать анализ и распознавание изображений нейронов на двухмерных срезах головного мозга экспериментальных животных.

2. Алгоритмы автоматического выделения объектов-нейронов должны выполняться как на всем изображении, так и на выделенной пользователем области изображения.

3. Автоматизированный анализ изображений нейронов должен проводиться с точностью, соизмеримой с точностью визуального анализа изображений нейронов, проводимого при скрининговом анализе без использования средств автоматизации анализа изображений.

4. В результате работы ПО АРИН должен осуществляться подсчет количества выделенных объектов, выделение их контуров, определение координат центров выделенных объектов, подсчет морфофункциональных характеристик объектов и сохранение этих данных на жестком диске.

На этапе анализа требований к системе было выявлено, что ПО АРИН должна реализовывать следующие процессы предметной области: 1) загрузка исходного изображения; 2) изменение масштаба исходного изображения; 3) запуск алгоритма автоматического выделения нейронов, включающего в том числе коррекцию результатов выполнения алгоритма и сохранение результатов выполнения алгоритма и выделение интересующей области на изображении.

Программа может быть использована при решении задачи оценки степени дегенерации ДА-ергических нейронов в КЧС по разнице в количестве у экспериментальных животных после введения специфического нейротоксина и в контрольной группе.

Программа функционирует на компьютерах типа IBM PC со следующими характеристиками: 1) процессор Intel Pentium III или Intel Core 2c тактовой частотой не менее 2.5 ГГц; 2) объем оперативной памяти – не менее 4 Гб; 3) объем необходимого пространства на жестком диске – не менее 40 Мб; 4) операционная система – Windows 2000 и выше. Программа позволяет работать с изображениями, представленными в виде файлов следующих форматов: BMP, GIF, JPG, JPEG, PNG и TIFF. Оптимальный размер изображения – 2040×1536.

В состав программы входят:

– ядро, обеспечивающее базовые функции работы с изображениями и матрицами;

– графический интерфейс пользователя, позволяющий использовать функциональные возможности программы и поддерживающий ряд вспомогательных функций;

– пользовательские библиотеки алгоритмов обработки и анализа изображений, необходимые для эксплуатации программы в тестовом режиме;

– модуль генерации отчетов, обеспечивающий вывод, хранение и накопление результатов анализа изображений нейронов в тестовом режиме.

Функциональная схема программы представлена на рис. 14.

5. Заключение

В данной главе рассмотрены основные условия, выполнение и исследование которых необходимо для порождения и извлечения знаний на основе анализа экспериментальных данных в биомедицинских исследованиях с помощью методов математических теорий распознавания образов и анализа изображений. Указанные условия включают:

1) адекватную задачам исследования содержательную и математическую постановку задач анализа данных;

2) анализ соответствия и объема имеющихся данных для решения поставленных задач;

3) выбор методов и алгоритмов решения поставленных задач;

4) характеризацию объектов анализа и построение формализованных моделей данных;

5) интерпретацию полученных результатов и получение математических оценок точности и качества решения.

Приведен пример, демонстрирующий возможности автоматизации анализа микроскопических изображений срезов мозга экспериментальных животных с помощью описанных информационных подходов и математических методов.

Теоретической и методической основой автоматизации обработки, анализа и оценивания экспериментальных данных, получаемых при исследовании мозга, являются математическая теория распознавания образов и математическая теория анализа изображений.

Роль изображения как объекта анализа и оценивания определяется его специфическими и неотъемлемыми информационными свойствами. Изображение представляет собой некоторую совокупность отображаемых исходных данных и средств их представления, результатов процессов формирования представлений изображения и процедур их преобразований, физических и логических аспектов и моделей объектов, событий и процессов, представленных на изображении.

Специфичность и сложность задач анализа и оценивания изображений связана с необходимостью достижения некоторого баланса между такими противоречивыми факторами, как цели и задачи анализа, природа зрительного восприятия, способы и средства получения, формирования и представления изображений, и математическими, вычислительными и технологическими инструментами анализа изображений.

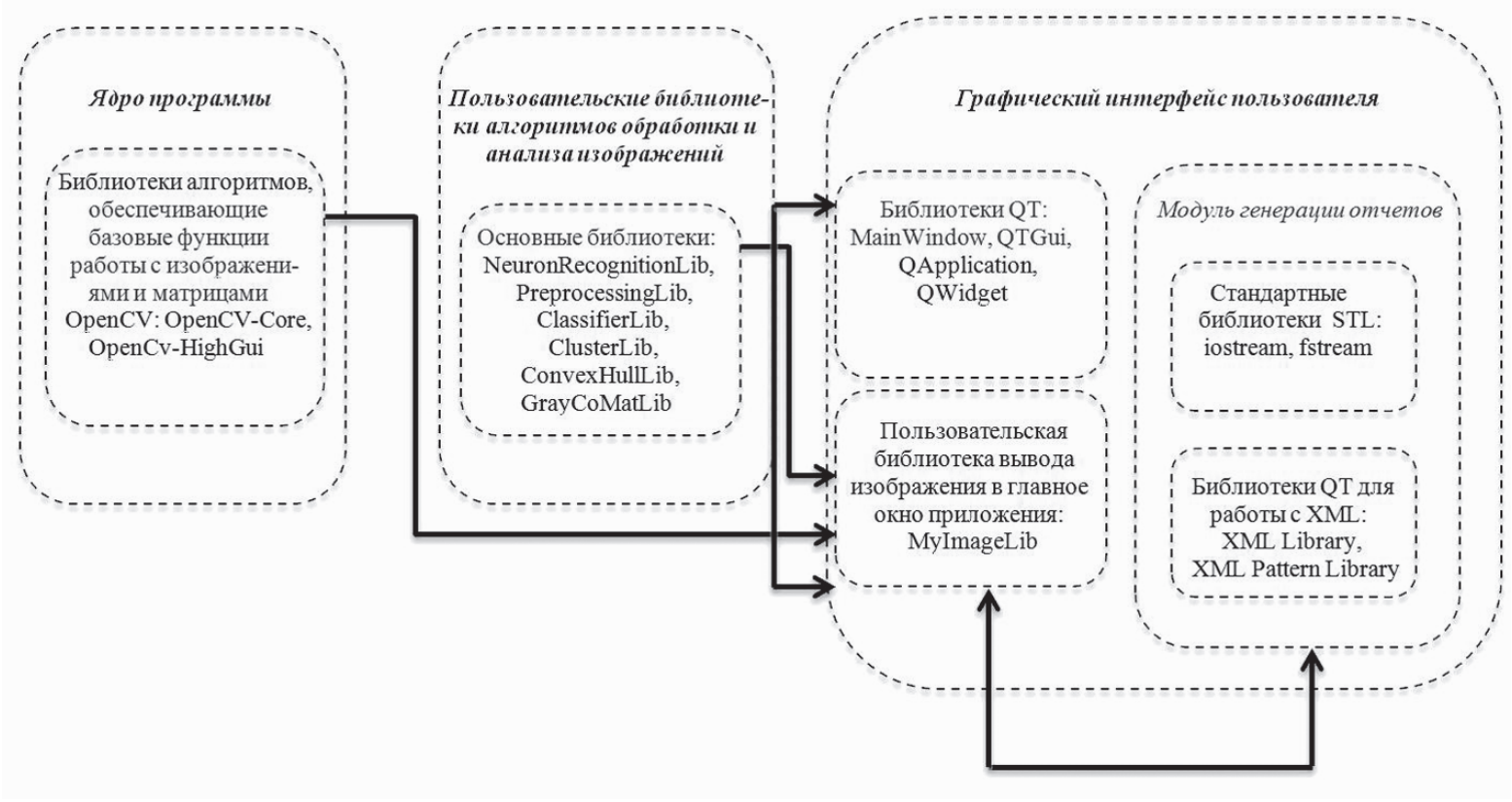


Рис. 14. Функциональная схема ПО АРИН

Разработка математического аппарата, обеспечивающего теоретическую основу автоматизации обработки, анализа, оценивания и понимания изображений, является одной из фундаментальных задач информатики. Автоматизация обработки и анализа изображений обеспечивает разработчикам автоматизированных систем, предназначенных для работы с изображениями, и конечным пользователям, в т.ч. не являющимся специалистами в области информатики и прикладной математики, возможность в автоматическом или интерактивном режимах:

1) разрабатывать, адаптировать и проверять методы и алгоритмы распознавания, понимания и оценивания изображений;

2) выбирать оптимальные или адекватные методы и алгоритмы распознавания, понимания и оценивания изображений;

3) проверять качество исходных данных и их пригодность для решения задачи распознавания изображений;

4) использовать стандартные алгоритмические схемы распознавания, понимания, оценивания и поиска изображений.

В рамках указанных теорий и прикладных разработок, выполненных на их основе, учёные и специалисты, занятые исследованием мозга, могут найти обширный набор методов и средств, необходимых для перехода к реальной автоматизации научных исследований, извлечения информации и знаний из результатов экспериментальных исследований и, в некоторой степени, для моделирования мозга и его функций. Для прикладного анализа изображений разработаны и готовы к использованию стандартные постановки задач, алгоритмические схемы и алгоритмические библиотеки. Используя эти инструменты, исследователь может синтезировать необходимую алгоритмическую схему обработки и анализа данных из стандартных алгоритмических блоков. Следующим этапом развития является разработка на базе этого инструментария стандартных информационных технологий и алгоритмическо-программных комплексов, специализированных для обработки и анализа данных, получаемых при исследованиях мозга.

Авторы надеются, что изложенный в данной главе материал поможет исследователям, работающим в области наук о жизни, получить представление о широких возможностях использования современных методов математической теории анализа и распознавания изображений и построенных на их основе информационных технологий в автоматизациинаучных исследований, в т.ч. для автоматизации анализа экспериментальных данных, представленных в виде изображений. Мы надеемся также, что данный материал будет способствовать постановке новых задач исследований, созданию новых математических и клинических моделей работы мозга и оптимизации постановок и планирования экспериментальных исследований.

Возможности современных математических методов существенно опережают степень их реального использования в исследованиях работы мозга человека.

Литература

Верхаген К., Дейн Р., Грун Ф., Йостен Й., Вербек П. Распознавание образов.Состояние и перспективы. Пер. с англ. Ред. И.Б. Гуревич. М.: Радио и связь, 1985.

Горелик А.Л., Гуревич И.Б., Скрипкин В.А. Современное состояние проблемы распознавания. Некоторые аспекты. М.: Радио и связь, 1985.

Гуревич И.Б. Изображений анализ // Большая российская энциклопедия. М.: БРЭ, 2008. Т. 11. С. 19-20.

Гуревич И.Б., Журавлев Ю.И. Математические и информационные аспекты исследования мозга // Вестник РАН. 2010. Т. 80. № 5-6. С. 503-513.

Гуревич И.Б., Трусова Ю.О. Тезаурус и онтология предметной области «Анализ изображений» // Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Знания – Онтологии – Теории» (ЗОНТ-09), 22-24 октября 2009 г., Новосибирск. Новосибирск: Институт математики им. С.Л. Соболева СО РАН, 2009. Т. 1. С. 213-222.

Гуревич И.Б., Журавлев Ю.И., Угрюмов М.В., Мягков А.А., Козина Е.А., Трусова Ю.О., Яшина В.В., Хаиндрава В.Г., Пронина Т.С. Патент № 2476932 на изобретение«Автоматизированная система анализа биомедицинских микроизображений для обнаружения и характеризации информативных объектов заданных классов на неоднородном фоне». Правообладатель: ФГБУН «Вычислительный центр им. А.А. Дородницына Российской академии наук». Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 27.04.2013 г.

Журавлев Ю.И. Об алгебраическом подходе к решению задач распознавания и классификации // Проблемы кибернетики. Вып. 33. М.: Наука, 1978.

Журавлев Ю.И., Гуревич И.Б. Распознавание образов и распознавание изображений // Распознавание. Классификация. Прогноз: Математические методы и их применение. М.: Наука, 1989. Вып.2. С. 5-72.

Журавлев Ю.И., Угрюмов М.В., Гуревич И.Б., Мягков А.А., Козина Е.А., Трусова Ю.О., Яшина В.В., Хаиндрава В.Г., Пронина Т.С. Патент № 118774 на полезную модель «Автоматизированная система анализа биомедицинских микроизображений для обнаружения и характеризации информативных объектов заданного вида на неоднородном фоне». Патентообладатель: ФГБУН «Вычислительный центр им. А.А. Дородницына Российской академии наук». Зарегистрировано в Государственном реестре полезных моделей Российской Федерации 27.07.2012 г.

Козина Е.А., Хаиндрава В.Г., Кудрин В.С., Кучеряну В.Г., Клодт П.Д., Бочаров Е.В., Раевский К.С., Крыжановский Г.Н., Угрюмов М.В. Экспериментальное моделирование функциональной недостаточности нигростриатной дофаминергической системы у мышей, Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. 2010. Вып. 96. 3. С. 270-282.

Пронина Т.С., Дильмухаметова Л.К., Угрюмов М.В. Модель гиперпролактинемии // Нейродегенеративные заболевания: фундаментальные и прикладные аспекты. М.: Наука, 2010. С. 229-234.

Хакимова Г..Р., Козина Е.А., Сапронова А.Я., Угрюмов М.В. Обратный захват дофамина в черной субстанции истриатуме на досимптомной и ранней симптомнойстадиях паркинсонизма у мышей-Докл. РАН. 2010. То. 435. № 2. С. 1-4.

Хакимова Г.Р., Козина Е.А., Сапронова А.Я., Угрюмов М.В. Выделение дофамина в черной субстанции и стриатуме на досимптомной и ранней симптомной стадиях паркинсонизма у мышей // Нейрохимия. 2011а. Т. 28. № 1. С. 42-48.

Хакимова Г.Р., Козина Е.А., Сапронова А.Я., Угрюмов М.В. Синтез дофамина в нигростриатной системе на досимптомной и ранней симптомной стадиях паркинсонизма у мышей // Докл. РАН. 2011б. Т. 440. № 6. С. 847-849.

Alavi A., Cavanagh B., Tuxworth G., Meedeniya A., Mackay-sim V. Automated classification of dopaminergic neurons in the rodent brain // Proceedings of International Joint Conference on Neural Networks, Atlanta, Georgia, USA, June 14-19. 2009. P. 81-88.

Albin R.L., Young A.B., Penney J.B. The functional anatomy of basal ganglia disorders // Trends Neurosci. 1989. Vol. 12. P. 366-75.

Benali A., Leefken I., Eysel U.T., Weiler E. A computerized image analysis system for quantitative analysis of cells in histological brain sections // J. Neurosci. Methods. 2003. Vol. 125, № 1-2. P. 33-43.

Dias A.V., Picanço-Diniz C.W, Lotufo R.A., Garçon S. Morphological segmentation of neurons and axon terminals in rat visual cortex // Perception. 1998. Vol. 27 (ECVP Abstract Supplement).

*Dougherty G. P*attern Recognition and Classification: An Introduction. Springer, 2012.

Fok Y.-L., Chan J., Chin R.T. Automated analysis of nerve-cell images using active contour models // IEEE Transactions on Medical Imaging. 1996. Vol. 15. № 3. P. 353-368.

Gonzalez R.C., Woods R.E. Digital Image Processing. 2 edition. Pearson Education, Inc., 2002.

Grenander U. General pattern theory. Oxford, 1993.
Gurevich I.B. Descriptive technique for image description, representation and recognition // Pattern Recognition and Image Analysis: Advances in Mathematical Theory and Applications in the USSR. 1991. Vol. 1. P. 50-53.
Gurevich I.B., Yashina V.V. Descriptive approach to image analysis: image formalization space // Pattern Recognition and Image Analysis: Advances in Mathematical Theory and Applications. Pleiades Publishing, Ltd., 2012. Vol. 22. № 4. P. 495-518.
Gurevich I., Kozina E., Myagkov A., Niemann H., Ugrumov M., Yashina V. An algorithmic scheme for construction and investigation of parkinson's disease model // Image Mining Theory and Applications: Proceedings of the 3rd International Workshop on Image Mining Theory and Applications – IMTA 2010 (in conjunction with VISIGRAPP 2010), Angers, France, May 2010. Ed. I. Gurevich, H. Niemann, O. Salvetti. Portugal.: INSTICC Press, 2010a. P. 105-114.
Gurevich I.B., Kozina E.A., Myagkov A.A., Ugryumov M.V., Yashina V.V. Automating extraction and analysis of dopaminergic axon terminals in images of frontal slices of the striatum // Pattern Recognition and Image Analysis: Advances in Mathematical Theory and Applications. 2010b. Vol. 20. № 3. P. 349-359.
Gurevich I., Myagkov A., Yashina V. A new image-mining technique for automation of parkinson's disease research // Proceedings of Workshop on Discrete Geometry and Mathematical Morphology (WADGMM), Istanbul, August 22, 2010. Eds. U. Kothe, A. Montanvert, P. Soille. 2010c. P. 91-95.
Gurevich I., Beloozerov V., Myagkov A., Sidorov Yu., Trusova Yu. Systems of neuron image recognition for solving problems of automated diagnoses of neurodegenerative diseases // Pattern Recognition and Image Analysis: Advances in Mathematical Theory and Applications. 2011a. Vol. 21. № 3. P. 392-397.
Gurevich I., Myagkov A., Nedzved' A., Yashina V. Extraction of neurons from images of mouse brain slices based on automated selection of connected morphological filters // Pattern Recognition and Image Analysis: Advances in Mathematical Theory and Applications. Pleiades Publishing, Ltd., 2011b. Vol. 21. № 3. P. 473-476.
Gurevich I.B., Myagkov A.A., Sidorov Yu.A., Trusova Yu.O., Yashina V.V. A new method for automated detection and identification of neurons in microscopic images of brain slices// Pattern Recognition and Image Analysis: Advances in Mathematical Theory and Applications. Pleiades Publishing, Ltd., 2012. Vol. 22.№ 4. P. 558-569.
Gurevich I., Myagkov A., Sidorov Yu., Trusova Yu., Yashina V. Detection and identification of neurons in images of microscopic brain sections // Proceedings of IMTA 2013 – 4th International Workshop on Image Mining. Theory and Applications, Barcelona, Spain, February 2013. Ed. I. Gurevich, H. Niemann, O. Salvetti. Scitepress, 2013. P. 127-136.
Inglis A., Cruz L., Roe D.L., Stanley H.E., Rosene D.L., Urbanc B. Automated identification of neurons and their locations // J. Microscopy. 2008. Vol. 230. № 3. P. 339-352.
Jahne B. Digital image processing. 6th revised and extended edition. Springer, 2005.
Kozina E.A., Khakimova G.R., Khaindrava V.G., Krasnov A.N., Georgieva S.G., Kerkerian-leGoffL., Ugrumov M.V. Tyrosine hydroxylase expression and activity in the nigrostriatal dopaminergic neurons ofMPTP-treated mice at the presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism // J. Neurol. Sci. 2014.
Masseroli M., Bollea A., Forloni G. Quantitative morphology and shape classification of neurons by computerized image analysis // Computer Methods and Programs in Biomedicine. 1993. Vol. 41. № 2. P. 89-99.
Meijering E. Neuron tracing in perspective // Cytometry. P. A. 2010. Vol. 77. № 7. P. 693-704.
Narro M.L., Yang F., Kraft R., Wenk C., Efrat A., Restifo L.L. Neuron metrics: software for semi-automated processing of cultured-neuron images // Brain Res. 2007. Vol. 1138. P. 57-75.
Otsu N.A. Threshold selection method from gray-level histograms // IEEE Transactions on systems, man, and cybernetics. 1975. Vol. 9. № 1. P. 62-66.
Peng S., Urbanc B., Cruz L., Hyman B.T., Stanley H.E. Neuron recognition by parallel potts segmentation // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2003. Vol. 100. № 7. P. 3847-3852.
Petrou M., Petrou C. Image Processing: The Fundamentals. 2nd edition. John Wiley & Sons, Ltd., 2010.
Pratt W.K. Digital Image Processing: PIKS Scientific Inside, 4th ed. Wiley-Interscience, 2007.
Rosenfeld A., Kak A.C. Digital Picture Processing. New York: Academic Press, Inc., 1982. Vol. 1, 2.
Russ J.C. The Image Processing Handbook, 6th ed. CRC Press, 2011.

Sciarabba M., Serrao G., Bauer D., Arnaboldi F., Borghese N.A. Automatic detection of neurons in large cortical slices // J. Neurosci. Methods. 2009. Vol. 182. P. 123-140.

Soille P. Morphological image analysis: Principles and applications. Berlin: Springer, 2004.

Solomon C., Breckon T. Fundamentals of digital image processing. UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2010.

Sonka M., Hlavac V., Boyle R. Image processing, analysis, and machine vision, 4th ed. cengage learning, 2014.

Tanimoto S.L. An interdisciplinary introduction to image processing: pixels, numbers, and programs. The MIT Press, 2012.

Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A. et al. Modeling of precliniical and clinical stages of Parkinson's disease in mice // Neurosci. 2011. Vol. 181. P. 175-188.

Vincent L. Morphological grayscale reconstruction in image analysis: Applications and efficient algorithms // IEEE Transactions on Image Processing. 1993. Vol. 2. P. 176-201.

Vincent L., Soille P. Watersheds in digital spaces: an efficient algorithm based on immersion simulations // IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intell. 1991. Vol. 6. № 12. P. 583-598.

Wang Y.-Y., Sun Y.-N., Chou-Ching K., Ju M.-S. Nerve cell segmentation via multi-scale gradient watershed hierarchies // Conference Proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. 2006. P. 6698-6701.

Wu Q., Merchant F., Castleman K. Microscope image processing. Elsevier Inc., 2008.

Система компьютерной реконструкции 3D-распределений нейронов

О.В. Евсеев, Е.В. Анциперов, Ю.В. Обухов, А.А. Колачева, М.В. Угрюмов

По данным доклада Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), неврологическими нарушениями страдает около одного миллиарда человек во всем мире (http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr04/ru/). При этом большой интерес вызывают нейродегенеративные заболевания, связанные с гибелью нейронов. К ним относятся болезни Паркинсона и Альцгеймера, рассеянный склероз и др., которые десятилетиями развиваются в скрытой форме и нередко проявляются на пике профессиональной и социальной активности человека. Несмотря на то что лечить больных начинают сразу после появления симптомов, заболевания быстро прогрессируют, приводя к инвалидизации и летальному исходу (Угрюмов, 2010).

Поэтому одной из важнейших задач нейронаук является разработка экспериментальных моделей социально-значимых заболеваний, в частности, связанных с гибелью нейронов, в том числе в определенной части головного мозга – черной субстанции (ЧС), что приводит к развитию болезни Паркинсона (БП) (Albin et al., 1989). Такие модели предназначены для разработки новых методов и технологий диагностики и лечения подобных заболеваний. Характерной особенностью БП является то, что она развивается в течение длительного времени (нескольких лет) в скрытой форме – без проявления симптомов, т.е. в «доклинической» стадии. Только после потери «порогового» числа нейронов черной субстанции (≈70%) начинают проявляться характерные симптомы – нарушение моторики, и заболевание переходит в клиническую стадию.

Предполагается, что по мере гибели нейронов в ЧС включаются механизмы пластичности мозга, способствующие компенсации функциональной недостаточности погибших нейронов. Детальное изучение данных компенсаторных процессов с целью управления ими направлено на разработку новых способов лечения БП (Угрюмов, 2010).

Испытаниям методов диагностики и лечения должны предшествовать разработка и апробация этих технологий на адекватных экспериментальных моделях заболеваний, созданных на животных, с использованием широкого спектра современных подходов. Разрабатываемые в Институте биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН модели различных стадий БП предполагают определение количества выживших нейронов и анализ их функционального состояния при различных схемах применения нейротоксина, с помощью которого моделируется БП (Ugrumov et al.,

---

Сокращения: БП – болезнь Паркинсона; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; КЧС – компактная часть черной субстанции; МИН – микроскопические изображения нейронов; ЧС – черная субстанция.

2011). Отсутствие автоматизации данного процесса делает экспериментальное моделирование БП чрезмерно трудоемким и дорогостоящим. Один высококвалифицированный специалист в состоянии осуществить обработку материала от одного животного по следующим этапам:

1) приготовление замороженных срезов;

2) иммуноцитохимическое выявление дофаминергических нейронов и их аксонов по содержащемуся в них ключевому ферменту синтеза дофамина – тирозингидроксилазе, и приготовление микроскопических препаратов;

3) перенос изображений тел нейронов и их аксонов в память компьютера, обведение вручную границ аксонов и тел нейронов, а также подсчет их количества, исчисляемого тысячами.

Для получения достоверных с биологической точки зрения результатов вышеописанные действия необходимо провести на большом количестве животных. Помимо высокой трудоемкости работа требует больших материальных затрат на оборудование и реактивы. За счет автоматизации и оптимизации процедуры обработки и анализа экспериментальных данных отработка моделей БП могла бы продвигаться гораздо быстрее и была бы экономически эффективнее при снижении временных и материальных затрат на исследования.

В качестве источника экспериментальных данных для построения модели БП используются цифровые микроскопические изображения нейронов (МИН) и волокон срезов головного мозга экспериментальных животных (разрешение 0.0117 мкм^2/пиксел^2). Выжившие нейроны на фотографиях представляют собой темные округлые клетки со светлым ядром и выявляются на фронтальных серийных срезах компактной части черной субстанции (КЧС) толщиной 20 мкм (рис. 1). Они являются ключевым звеном регуляции моторного поведения. Прогрессирующая дегенерация нейронов приводит к развитию БП.

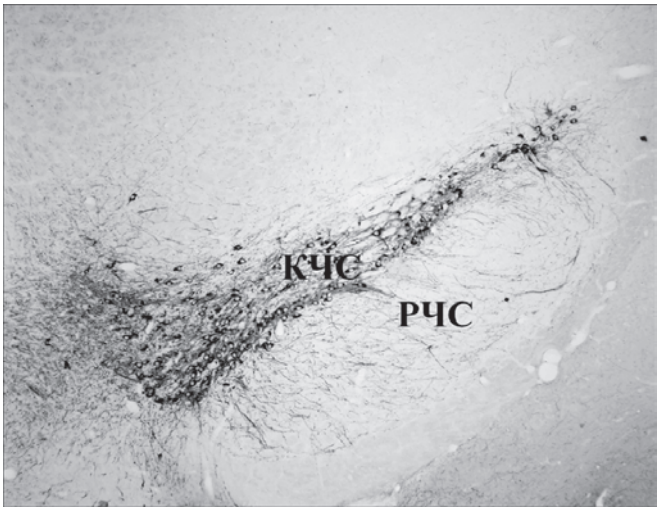


Рис. 1. Тирозингидроксилаза-иммунореактивные тела нейронов в компактной части черной субстанции (КЧС), а также волокна в ретикулярной части черной субстанции (РЧС)

Автоматизация анализа МИН и отростков нейронов позволяет снизить материальные затраты на порядок, а временные затраты на два порядка (Gurevich et al., 2011). Однако помимо задач распознавания нейронов на каждом изображении срезов ЧС встает задача упрощения анализа характера распределения нейронов по всему объему черной субстанции.

Наша работа посвящена созданию программно-алгоритмического обеспечения визуализации трехмерных распределений нейронов по двумерным данным (Обухов и др., 2011), извлекаемым из цифровых изображений срезов ЧС с помощью систем автоматического распознавания (Gurevich et al., 2010).

В процессе проектирования системы реконструкции 3D-распределений нейронов на основе модели БП и серий изображений 2D-срезов мозга было выяснено, что ее функционирование должно осуществляться в виде цикла (конвейера) последовательных шагов. Такими шагами должны являться следующие:

1) выравнивание слоев – выделение на изображениях срезов согласованных между собой областей анализа и введение локальных (2D) координатных систем срезов, удобным образом связанных с выделенными областями, определение глобальной трехмерной (3D) системы координат и соотнесение с ней локальных координат всех срезов;

2) выделение нейронов – редактирование и согласование по срезам данных автоматического распознавания нейронов, определение их локальных координат, пересчет локальных 2D-координат к 3D-глобальным с целью последующей 3D-визуализации самих нейронов;

3) кластеризация нейронов – построение двумерных непрерывных распределений плотности нейронов в срезах на основе нейробиологической модели БП и аппроксимации распределений моделями гауссовых смесей, известной как задача кластеризации;

4) выравнивание кластеров – определение типов кластеров и выравнивание их в соседних слоях по типу и затем по положению с целью получения плавных и соответствующих модели БП трехмерных объектов – 3D-поверхностей постоянного уровня распределений плотности нейронов;

5) 3D-реконструкция распределений плотности нейронов по объему ЧС на основе аппроксимации поверхностей постоянного уровня сплайнами для межслойной интерполяции данных.

Основным этапом, требующим детальной теоретической и практической проработки, является создание алгоритмов кластеризации и 3D-реконструкции.

Черная субстанция расположена в среднем и промежуточном мозгу и образована серым веществом, имеет форму полосы, более широкой в средней части и суживающейся по концам, она изогнута, с вогнутостью, направленной назад. Поскольку обе части ЧС в поперечном сечении – в плоскости срезов – представляют собой часть овала, предлагается разумным выделять их областью интересов (анализа) с эллиптической границей, нижняя часть которой проходит по нижней границе коры. В описанной области анализа располагаются интересующие нас нейроны, которые имеют тенденцию к группированию.

Модельно распределения нейронов принято представлять в виде некоторых скоплений – кластеров, причем основными интересующими специалистов характеристиками кластеров являются количество содержащихся в них нейронов и пространственное расположение самих кластеров.

Выделяемые на срезах специалистами «вручную» кластеры имеют, как правило, достаточно простую форму – это выпуклые области, приблизительно овальной формы, могут быть достаточно вытянутыми в некотором направлении, как правило, не пересекают друг друга. Аппроксимация границ областей кластеров регулярными эллиптическими кривыми вопросов у специалистов не вызывает. К примеру, на рис. 2 приведена разметка кластеров на некотором срезе, сделанная нейробиологом, и рядом приведена аппроксимация этих же областей эллиптическими кривыми. Видно, что не происходит потери информации при переходе на формализованную разметку, что подтверждают и специалисты.

Возможность задавать кластеры эллиптическими областями имеет огромные преимущества:

1. Общая эллиптическая кривая задается достаточно простым математическим выражением (a и b – полуоси, φ – угол наклона):

$$\frac{x'^2}{a^2}+\frac{y'^2}{b^2}=1,$$
$$x'=\cos(\varphi)x+\sin(\varphi)y,\quad y'=-\sin(\varphi)x+\cos(\varphi)y,$$

поэтому ее легко задавать и производить с ней вычисления.

2. В полярных координатах эллиптическая кривая задается формулой:

$$\rho(\psi)=\frac{b}{\sqrt{1-\varepsilon^2\cos^2(\psi-\varphi)}},\quad \varepsilon^2=1-\frac{b^2}{a^2},$$

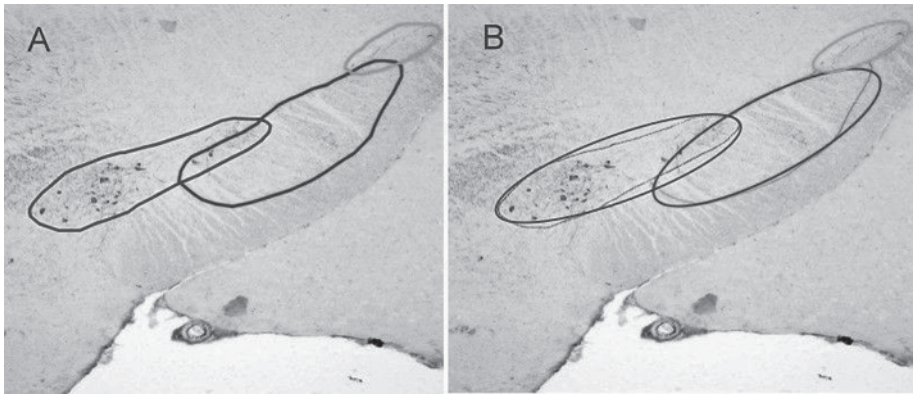


Рис. 2. Разметка кластеров (ИБР РАН, ИРЭ РАН) нейронов на срезе ЧС

А – разметка кластеров на срезе, сделанная нейробиологом вручную; В – аппроксимация этих же кластеров регулярными (эллиптическими) кривыми

что позволяет почти равномерно распределить точки по кривой (для $\psi=2\pi/k$) и отобразить их на цифровом экране.

3. Квадратичная форма в экспоненте Гауссова распределения:

$$F(x,y)=\frac{N}{2\pi\sigma_x\sigma_y\sqrt{1-\rho^2}}\exp\left(-\frac{\xi^2-2\rho\xi\eta+\eta^2}{2\left(1-\rho^2\right)}\right),$$

где $\xi=\dfrac{x-\langle x\rangle}{\sigma_x}$, $\eta=\dfrac{y-\langle y\rangle}{\sigma_y}$,

при фиксированном ее значении задает эллипс, что позволяет рассматривать последний как линию постоянного значения (уровня) распределения.

Последнее замечание позволяет трактовать эллиптические кластеры как уровни распределений, известных в статистике как гауссовы смеси, а задачу кластеризации – как задачу нахождения параметрического распределения вероятностей, наилучшим образом описывающего дискретные экспериментальные данные (координаты нейронов).

К счастью, на сегодняшний день известны хорошие алгоритмы решения приведенной выше формализованной задачи. Одним из таких широко известных алгоритмов, позволяющих эффективно работать с большими объемами данных, является EM-алгоритм (Neal, Hinton, 1999). Его название происходит от слов «expectation–maximization», что переводится как «ожидание–максимизация». Это связано с тем, что каждая итерация содержит два шага – вычисление математических ожиданий (expectation) и максимизацию (maximisation). Перейдем к изложению адаптированной к данному проекту версии EM-алгоритма.

В основе идеи EM-алгоритма лежит предположение, что исследуемое множество данных может быть смоделировано с помощью линейной комбинации двумерных нормальных распределений (гауссовых смесей), а целью является оценка параметров, которые максимизируют логарифмическую функцию правдоподобия, используемую в качестве меры качества модели. Иными словами, предполагается, что данные в каждом кластере подчиняются определенному закону распределения, а именно – нормальному распределению (рис. 3). С учетом этого предположения можно определить параметры – математическое ожидание и дисперсию, которые соответствуют закону распределения элементов в кластере, наилучшим образом «подходящему» к наблюдаемым данным.

Таким образом, мы предполагаем, что любое наблюдение принадлежит ко всем кластерам, но с разной вероятностью. Тогда задача будет заключаться в «подгонке» распределений смеси к данным, а затем в определении вероятностей принадлежности наблюдения к каждому кластеру. Очевидно, что наблюдение должно быть отнесено к тому кластеру, для которого данная вероятность выше.

Среди преимуществ EM-алгоритма можно выделить следующие:

– Надежная статистическая основа.

– Линейное увеличение сложности при росте объема данных.

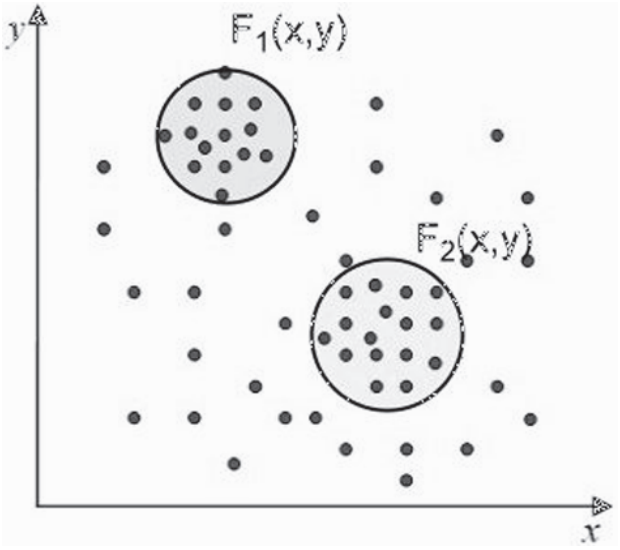


Рис. 3. Распределение элементов в кластерах

– Устойчивость к шумам и пропускам в данных.
– Возможность построения желаемого числа кластеров.
– Быстрая сходимость при удачной инициализации.

Однако алгоритм имеет и ряд недостатков. В частности, при неудачной инициализации сходимость алгоритма может оказаться медленной. Кроме этого, алгоритм может остановиться в локальном минимуме и дать квазиоптимальное решение.

Как отмечалось выше, EM-алгоритм предполагает, что кластеризуемые данные подчиняются линейной комбинации (смеси) нормальных (гауссовых) распределений, плотность вероятности которых имеет вид:

$$F(x,y)=\frac{N}{2\pi\sigma_x\sigma_y\sqrt{1-\rho^2}}\exp\left(-\frac{\xi^2-2\rho\xi\eta+\eta^2}{2\left(1-\rho^2\right)}\right),\quad \xi=\frac{x-\langle x\rangle}{\sigma_x},\quad \eta=\frac{y-\langle y\rangle}{\sigma_y},$$

где $\langle x\rangle$, $\langle y\rangle$ – математическое ожидания, $\sigma_{x,}\ \sigma_y$ – дисперсия, ρ – коэффициент корреляции.

Введем в рассмотрение функцию $\delta^2(x,y)=\left(\xi^2-2\rho\xi\eta+\eta^2\right)/\left(1-\rho^2\right)$, которую будем рассматривать как обобщенное расстояние от (x, y) до $\left(\langle x\rangle,\langle y\rangle\right)$.

Алгоритм предполагает, что данные подчиняются смеси двумерных нормальных распределений. Модель, представляющая собой смесь гауссовых распределений, задается в виде:

$$F(x,y) = \sum_i \omega_i F(x,y \mid i),$$

где $F(x, y \mid i)$ – нормальное распределение для i-го кластера, ω – доля (вес) i-го кластера в гауссовой смеси.

Существуют два подхода к решению задач кластеризации: основанный на расстоянии и основанный на плотности. Первый подход заключается в определении областей пространства признаков, внутри которых точки данных расположены ближе друг к другу, чем к точкам других областей, относительно некоторой функции расстояния (например обобщенной). Второй – обнаруживает области, которые являются более «заселенными», чем другие. Алгоритмы кластеризации могут работать сверху вниз (дивизимные) и снизу вверх (агломеративные). Агломеративные алгоритмы, как правило, являются более точными, хотя и работают медленнее.

Используемый нами ЕМ-алгоритм основан на вычислении расстояний. Он может рассматриваться как обобщение кластеризации на основе анализа смеси вероятностных распределений. В процессе работы алгоритма происходит итеративное улучшение решения, а остановка осуществляется в момент, когда достигается требуемый уровень точности модели. Мерой в данном случае является монотонно увеличивающаяся статистическая величина, называемая логарифмическим правдоподобием L:

$$L\left(\left[x_j, y_j\right]\right) = \ln\left(\prod F\left(x_j, y_j\right)\right) = \sum \ln\left(\sum_i \omega_i F\left(x_j, y_j \mid i\right)\right).$$

Целью алгоритма является оценка средних значений $\langle x \rangle$, $\langle y \rangle$,параметров σ_{xi}, σ_{yi} и ρ_i весов смеси ω_i для функции распределения вероятности $F(x, y)$, описанной выше, таких что они доставляют максимум функции правдоподобием L (принцип максимума правдоподобия – МП) при заданном наборе координат нейронов

$X = [(x_i, y_j] = 1,2, \ldots, n)$.

Помимо введенных выше параметров введем еще так называемые «скрытые» параметры $g_{ij} = \mathrm{P}(x_i, y_j)$ – апостериорные вероятности принадлежности (x_1, yi) (x_i, y_j) i-му кластеру. Рекуррентная максимизация функции правдоподобия L на основе ЕМ-алгоритма осуществляется по следующей принципиальной схеме:

шаг E: по формуле Байеса уточняются (оцениваются) «скрытые» параметры g_{ij}:

$$g_{ij} = \frac{\omega_i F\left(x_j, y_j \mid i\right)}{\sum \omega_{i'} F\left(x_j, y_j \mid i'\right)}$$

шаг M: с использованием g_{ij} уточняются параметры $\left(\langle x_i \rangle, \langle y_i \rangle\right)$, σ_{xi}, σ_{yi}, ρ_i, ω_i (на самом деле приведенные ниже оценки максимизируют L при заданных g_{ij}):

$$\omega_i = \frac{1}{n}\sum g_{ij};$$

$$\langle x_i \rangle = \frac{1}{n\omega_i}\sum g_{ij} x_j ; \langle y_i \rangle = \frac{1}{n\omega_i}\sum g_{ij} y_j ;$$

$$\sigma_{xi} = \sqrt{\frac{1}{n\omega_i}\sum g_{ij}\left(x_j - \langle x_i \rangle\right)^2} ; \sigma_{yi} = \sqrt{\frac{1}{n\omega_i}\sum g_{ij}\left(y_j - \langle y_i \rangle\right)^2} ;$$

$$\rho_i = \frac{1}{n\omega_i \sigma_{xi}\sigma_{yi}}\sum g_{ij}\left(x_j - \langle x_i \rangle\right)\left(y_j - \langle y_i \rangle\right).$$

При рассчитанных параметрах принадлежность (x_i,y_j) i-му кластеру определяется в соответствии с: i_x = argmax (g_{ij}) Итерации Е-М продолжаются до тех пор, пока принадлежность кластерам не перестанет изменяться.

Решение задачи в данной общей постановке сложно даже для ее численной реализации. Поэтому часто прибегают к некоторым ограничениям, упрощающим решение (Мандель, 1988). Так, в алгоритме кластеризации *k*-means все ω_i всегда полагаются равными $\omega_i = 1/k$, также равными и $\sigma_{xi} = \sigma_{yi} = 1$, а $\rho_i = 0$ и оптимизация осуществляется только по положениям кластеров $\left(\langle x_i \rangle, \langle y_i \rangle\right)$. При этом алгоритм кластеризации *k*-means осуществляется по следующей принципиальной схеме:

шаг Е: «скрытые» параметры g_{ij} уточняются (оцениваются) по формуле:

$$g_{ij} = \frac{F\left(x_j, y_j \mid i\right)}{\sum F\left(x_j, y_j \mid t\right)}$$

шаг М: уточняются параметры $\left(\langle x_i \rangle, \langle y_i \rangle\right)$:

$$\langle x_i \rangle = \sum g_j x_j ; \langle y_i \rangle = \sum g_j y_j .$$

Отметим, что принадлежность $\left(x_j, y_j\right)$ i-му кластеру определяется в *k*-means по минимуму $\delta_{ij}^{\ 2}$ – евклидова расстояния $\left(x_j, y_j\right)$ до $\left(\langle x_i \rangle, \langle y_i \rangle\right)$ – центра i-го кластера.

В случае когда кластеры пересекаются слабо, также можно упростить ЕМ-алгоритм даже в общем его виде, если учесть, что при этом все распределения $F\left(x_j, y_j \mid i\right)$ очень малы в сравнении с тем $F\left(x_j, y_j \mid i^x\right)$, к центру $\left(\langle x_{i^x} \rangle, \langle y_{i^x} \rangle\right)$ которого ближе всего $\left(x_j, y_j\right)$. При этом адаптированный алгоритм кластеризации осуществляется по следующей схеме:

шаг E: «скрытые» параметры g_{ij} уточняются (оцениваются) по формуле:

$g_{ij} = 1$ для $i = i^x$ *и* $g_{ij} = 0$ для остальных i .

шаг M: уточняются параметры $\left(\langle x_i \rangle, \langle y_i \rangle\right)$, σ_{xi}, σ_{yi}, ρ_i, при $\omega_i = k_i/n$, – число нейронов, для которых $i = i^x$ (число нейронов, для которых центр i-го кластера – ближайший):

$$\langle x_i \rangle = \frac{1}{k_i}\sum x_j ; \langle y_i \rangle = \frac{1}{k_i}\sum y_j ;$$

$$\sigma_{xi} = \sqrt{\frac{1}{k_i}\sum\left(x_j - \langle x_i \rangle\right)^2} ; \sigma_{yi} = \sqrt{\frac{1}{k_i}\sum\left(y_j - \langle y_i \rangle\right)^2} ;$$

$$\rho_i = \frac{1}{k_i \sigma_{xi} \sigma_{yi}}\sum\left(x_j - \langle x_i \rangle\right)\left(y_j - \langle y_i \rangle\right),$$

причем суммирование в приведенных формулах идет только по нейронам кластера ($g_{ij} = 1$).

Алгоритм начинает работу с инициализации, т.е. некоторого начального числа кластеров и некоторого приближенного решения, которое может быть выбрано случайно или задано пользователем исходя из некоторых априорных сведений об исходных данных (например, на основе обобщенной модели Паркинсона). Наиболее общим способом инициализации является присвоение элементам $\left(\langle x_i \rangle, \langle y_i \rangle\right)$ математических ожиданий некоторых априорных значений, а начальные ω, σ_{xi}, σ_{yi} и ρ_i задаются как в алгоритме *k*-means: $\sigma_{xi} = \sigma_{yi} = 1$, $\rho_i = 0$.

Для проверки работы адаптированного алгоритма EM нами было разработано небольшое приложение на MatLab, CEM, внешний вид интерфейсной формы которого приведен на рис. 4.

Результаты тестирования CEM (MatLab) для проверки адаптированного алгоритма EM на реальных срезах ЧС показали замечательные его характеристики: при заданном количестве кластеров и при достаточно грубых априорных расположениях их центров $\left(\langle x_i \rangle, \langle y_i \rangle\right)$ распределение нейронов по кластерам устанавливается за 4–5 итераций и параметры кластеров σ_{xi}, σ_{yi} и ρ_i хорошо соответствуют ожидаемым значениям.

После кластеризации нейронов на каждом срезе необходимо провести очевидные шаги, связанные с выравниванием изображений друг относительно друга по некоторым абсолютным признакам (например по границе коры), для последующего верного построения их трехмерных распределений в полном объеме черной субстанции.

Общая задача реконструкции 3D-поверхностей постоянного уровня распределений нейронов на основе двумерных контуров – границ кластеров и содержащей их области анализа, может решаться различными методами реконструкции, однако

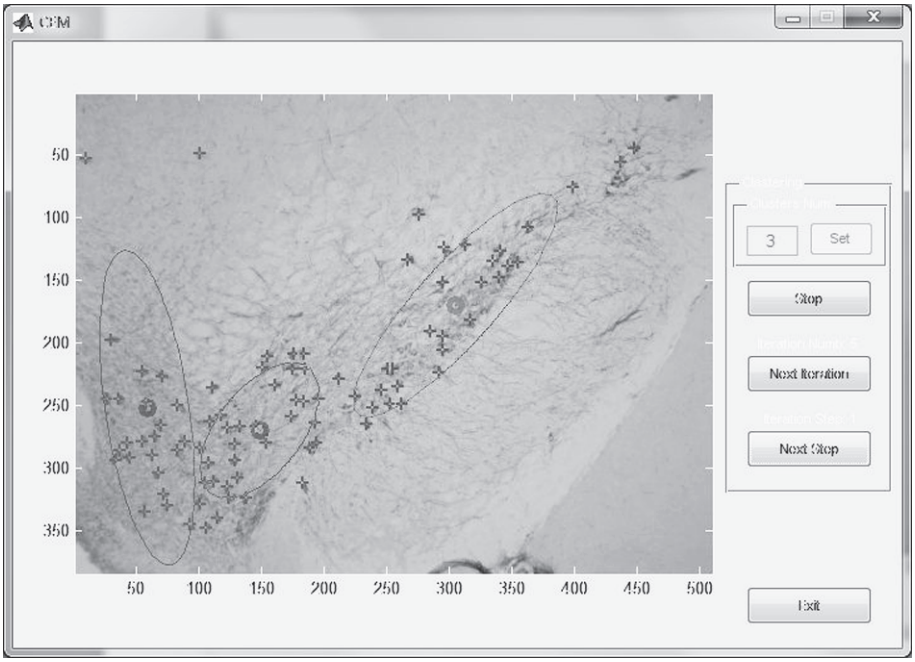


Рис. 4. Интерфейс экспериментального ПО CEM (MatLab) для проверки адаптированного алгоритма EM на реальных срезах ЧС

ввиду сложности задачи в общей постановке целесообразно использовать выявленную специфику проблемы для ее возможного упрощения. Спецификой задачи является тот факт, что все слои являются параллельными, а контуры могут быть формализованы до регулярных (эллиптических) кривых. Для таких слоев достаточно легко строится межслойная интерполяция также контурами эллиптической формы, например при помощи сплайнов (интерполируются только шесть параметров: пять параметров, задающих эллипс, и шестой – максимальную плотность).

В компьютерном моделировании сплайны – это степенные функции одного или двух переменных, графическими образами которых являются кривые линии или криволинейные поверхности. Они служат, в частности, для решения задачи интерполяции, то есть нахождения промежуточных точек кривой линии или поверхности, заданной опорными точками. Уравнения сплайнов имеют обычно степень не выше третьей, так как именно такая степень является минимально необходимой для гладкой стыковки криволинейных участков. В компьютерной графике широко применяются базовые сплайны, или B-сплайны («би-сплайны») (Piegl, Tiller, 1997):

$$C(u) = \sum_{j=1}^{n} B_{j,p}(u) P_j \ ,$$

где $C(u)$ – сплайн, параметризованный переменной u (обычно берут $u \in [0;1]$), $\{B_{j,p}(u)\}$ – базис B-сплайнов. Набор n контрольных точек $\{P_j\}$ однозначно задает

форму и положение в пространстве сплайна $C(u)$, который, приближая последовательность $\{P_j\}$, может и не проходить ни через одну из этих точек. Другими словами, $C(u)$ – это кривая наперед заданной степени гладкости, максимально плотно приближающая пространственную ломаную с вершинами в точках $\{P_j\}$. Характерным свойством сплайнов является их локальность: изменение одной из контрольных точек $\{P_j\}$ ввиду финитности каждого из B-сплайнов $B_{j,p}(u)$ приведет к деформации $C(u)$ лишь в ближайшей окрестности P_i.

Необходимо отметить, что при моделировании участков поверхности с помощью B-сплайновых примитивов требуется обычно больше вычислений, чем для других сплайнов. Например, по сравнению со сплайнами Безье (Роджерс, Адамс, 2001) требуется в девять раз больше вычислений. Однако этот недостаток B-сплайнов компенсируется их повышенной гладкостью, достигаемой без введения дополнительных опорных точек.

Простая методика моделирования пространственных поверхностей сложной формы включает следующие шаги:

1) поверхность представляется набором принадлежащих ей характерных точек. Выбирается расположение координатных осей *u* и *v*. Характерные точки принимаются за опорные точки B-сплайновых примитивов;

2) образуется «окно», включающее 16 опорных точек (по 4 вдоль каждой координатной оси). Происходит вычисление координат текущих точек примитива;

3) по окончании развертывания очередного примитива окно перемещается на один ряд опорных точек по оси u или v. В результате перемещения в окно входят 12 прежних опорных точек и 4 новые точки. Для этого набора опорных точек по выражениям вычисляются координаты текущих точек;

4) пункт 3 выполняется до тех пор, пока не будут использованы все опорные точки. После этого выполняется визуальный контроль смоделированной поверхности. Для коррекции рельефа по результатам контроля изменяется положение опорных точек.

Привязка B-сплайнового сегмента к центральной части характеристического многогранника приводит к тому, что смоделированная поверхность не проходит через крайние (граничные) характерные точки исходной поверхности. Чтобы получить сегменты, примыкающие к границам поверхности, нужно иметь дополнительные ряды опорных точек. Для решения задачи прибегают к так называемым кратным граничным опорным точкам. Кратными называются опорные точки, имеющие различные обозначения, но одинаковые координаты. Кратные опорные точки образуются повторением координат граничных опорных точек и присвоением новым точкам уникальных обозначений. Каждая граничная опорная точка получает одну дополнительную, кратную себе, а четыре угловые точки получают по три дополнительные опорные точки каждая.

При анализе проблемы реконструкции трехмерного распределения нейронов были исследованы методы построения поверхностей сплайнами или кривыми других полиномиальных типов в ситуации, близкой к нашей, и было выявлено, что

наиболее подходящим для реконструкции является так называемый лофтинг-метод (Park, 2001).

Лофтинг-метод восстанавливает поверхность 3D-объекта неравномерными рациональными B-сплайнами, которые, в частности, хорошо аппроксимируют регулярные контуры объекта. Лофт-объекты строятся путем формирования оболочки по опорным сечениям, расставляемым вдоль некоторой заданной траектории. Оболочка как бы натягивается на сечения вдоль указанного пути, а в результате получается трехмерная модель. Данный метод моделирования прекрасно подходит для тех моделей, форма которых может быть охарактеризована некоторым набором поперечных сечений, как в нашем случае. В основе любого подобного объекта всегда лежат траектория (путь) и одно или более сечений. Путь задает основную линию лофт-объекта и может иметь форму прямой, окружности, произвольной кривой и т.п., а сечения определяют его форму и тоже могут быть самыми разнообразными (в разумных пределах). При использовании нескольких сечений они размещаются вдоль пути по указанному пользователем принципу, а в случае одного сечения данная форма размещается на обоих концах пути. Оба типа структурных элементов – путь и сечения – в общем случае представлены обычными сплайнами, т.е. наборами опорных вершин. Число опорных вершин поперечных сечений может быть произвольным, но это число должно быть во всех задействованных в лофт-объекте сечениях одинаково. Кроме того, если сечение представлено составными формами, то данные формы должны иметь одинаковый порядок вложения. Это означает, что если первое сечение содержит внутри одного контура два других контура, то и все последующие сечения должны быть сформированы по тому же принципу. А если в копии данной составной формы переместить два внутренних сплайна вне исходного, то ее уже нельзя будет указать в качестве второго сечения. Правда, при желании в ряде случаев данное ограничение можно обойти, превратив обычные замкнутые сплайны в разомкнутые. Форма лофт-объекта определяется не только за счет пути и определенного набора сечений – не менее важны положение внутренних сечений вдоль пути и согласование первых вершин каждой формы поперечного сечения. От размещения сечений вдоль пути зависит то, как и в какой момент будет смоделирован переход от одного сечения к другому, а согласование вершин позволяет избежать перекручивания моделей при переходе от сечения к сечению или, наоборот, при необходимости искусственно скручивать объекты. Качество лофтинг-метода сильно зависит от качества контуров, особенно в случае ручной обводки.

Другие технические проблемы создания лофт-объектов касаются плотности каркаса поверхности (или оболочки). Когда принимается решение о сложности лофт-объекта, необходимо сделать выбор из ряда компромиссов:

– Плотные каркасы показывают большее число деталей, чем разреженные.

– Плотные каркасы деформируются более однородно, чем разреженные.

– Плотные каркасы визуализируются в более гладкий профиль, чем разреженные.

– Разреженные каркасы используют меньше памяти и отображаются быстрее.

– С разреженными каркасами, как правило, проще и быстрее работать, нежели с плотными.

Лучшее решение достигается путем создания как можно более разреженных каркасов, удовлетворяющих требованиям проекта по визуализации распределений. Впрочем, в программное обеспечение, предназначенное для визуализации распределений нейронов, при разработке закладывается возможность ручного выбора «гладкости» 3D-объектов – плотности каркаса поверхности.

При формировании реконструкции 3D-поверхностей постоянного уровня распределений нейронов при помощи лофт-объектов особое внимание должно быть уделено концам лофт-объектов и их конструкции (проблема создания наконечников). Каркасы границ кластеров должны представлять собой замкнутые поверхности и создавать визуальную иллюзию цельности.

Описанные выше алгоритмы используются в системе реконструкции трехмерного распределения нейронов по цифровым изображениям срезов ЧС. Заложенный в системе конвейер операций отражен в интерфейсе пользовательской программы – на форме представлен следующий набор вкладок: выравнивание слоев, выделение нейронов, кластеризация, выравнивание кластеров, 3D-представление (рис. 5). На каждой вкладке обеспечиваются средства ручного и автоматического редактирования для соответствующего шага процесса.

Со стороны программной реализации системы за каждым из шагов процесса реконструкции закреплен свой отдельный программный модуль, содержащий набор соответствующих данному шагу алгоритмов. Каждый из этих модулей имеет свои входные/выходные данные, хранящиеся в отдельных файлах БД проекта, и связан с соответствующей страницей интерфейса системы для редактирования входных и анализа выходных данных.

Модуль «выравнивание слоев» предназначен для выравнивания изображений соседних срезов (текущего относительно предыдущего) и выделения эллиптичес-

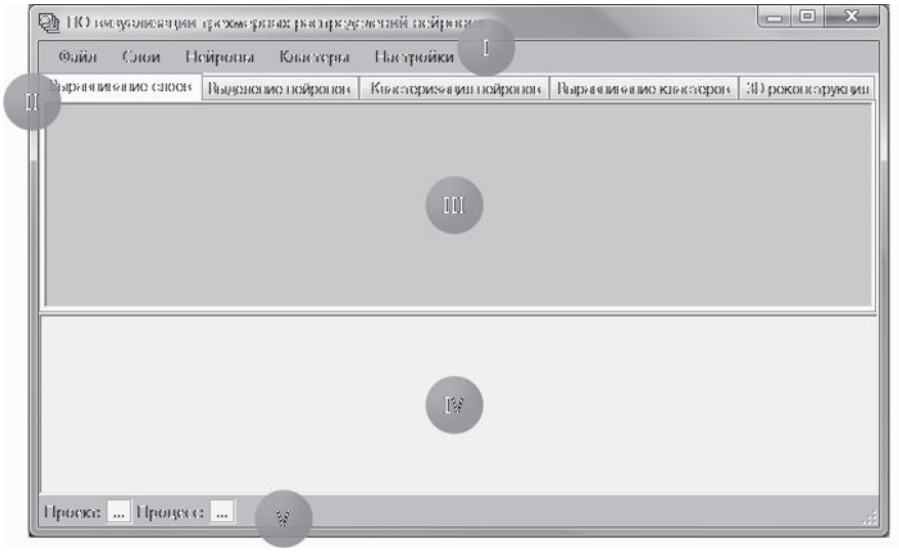


Рис. 5. Интерфейс разрабатываемого программного комплекса: главное меню (I); вкладки 5 шагов процесса реконструкции (II); панель вывода соответствующей графической информации (III); панель выбора среза (IV); строка состояния (V)

кой области анализа (для текущего среза), с которой связывается система локальных координат данного среза (рис. 6а). Модуль «выделение нейронов» (рис. 6б) предназначен для редактирования координат нейронов, помеченных вручную или автоматически распознанных с помощью алгоритмов распознавания, разработанных соисполнителями по проекту ВЦ им. А.А. Дородницына РАН (Gurevich et al., 2010).

Вкладка «кластеризация» предназначена для автоматического выделения групп нейронов на срезах с использованием адаптированного EM-алгоритма (рис. 7). С помощью модуля «выравнивание кластеров» согласовываются кластеры на соседних срезах по типам. Однако перед согласованием необходимо каждому из кластеров приписать его уникальный на срезе тип. Эта процедура может быть осуществлена как вручную, так и автоматически по критерию ближнего по евклидову расстоянию кластера предыдущего слоя (если кластеры предыдущего слоя уже типизированы).

Последний шаг процесса непосредственно «3D-реконструкция» (рис. 8), на котором на основе плоских, параллельных контуров, как на формах лофт-объектов, строятся 3D-поверхности пространственных распределений. На этой вкладке пользователь осуществляет визуальный анализ рассчитанных распределений, представленных 3D-объектами. Средства DirectX-3D управления камерой предоставляют возможность быстро и просто реализовать такие функции анализа и визуализации 3D-модели, как изменение точки обзора, повороты, приближение к объекту или удаление от него и т.д.

Использования достижений современной математической теории в прикладных нейробиологических задачах позволяет осуществлять надежную и эффективную автоматизацию извлечения информации о нейронах из изображений срезов головного мозга и реконструкцию их трехмерного распределения, обеспечивая существенную экономию времени и материальных затрат на построение моделей

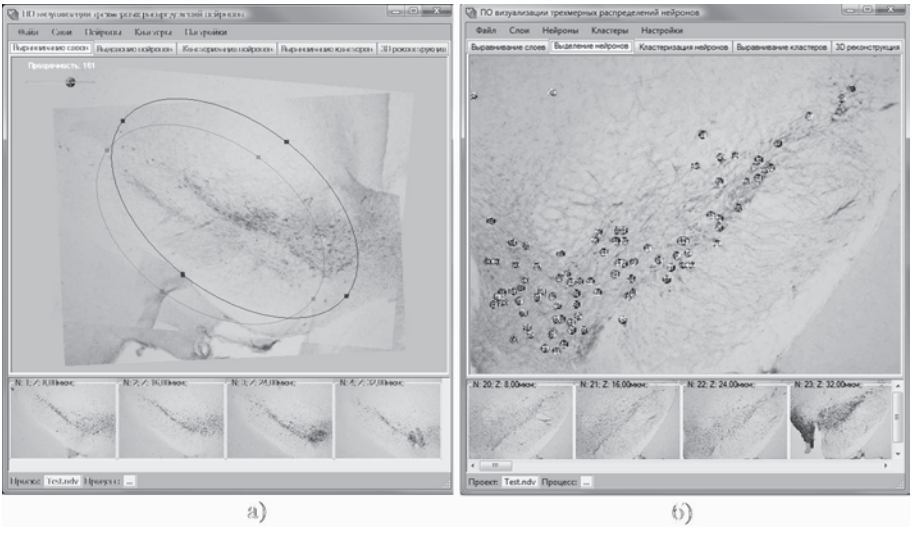


Рис. 6. Интерфейс модулей: а – «выравнивание слоев», б – «выделение нейронов»

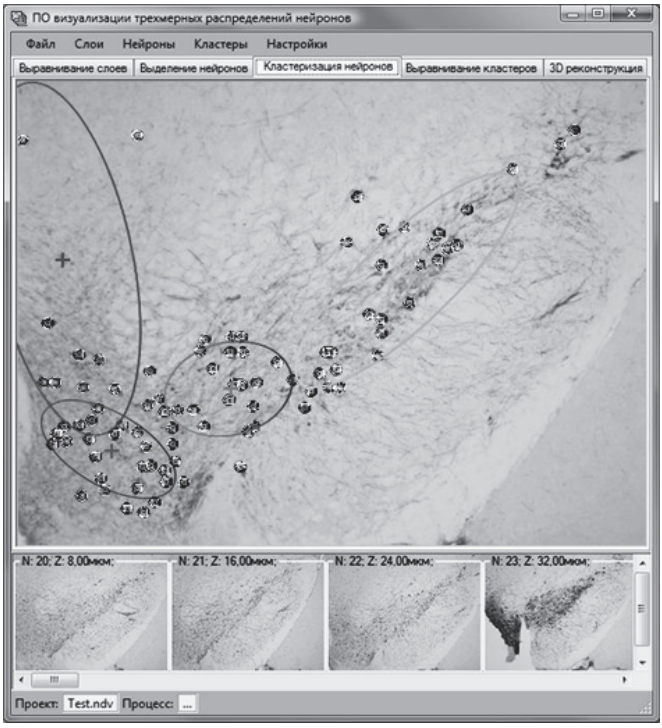


Рис. 7. Интерфейс модуля «кластеризация»

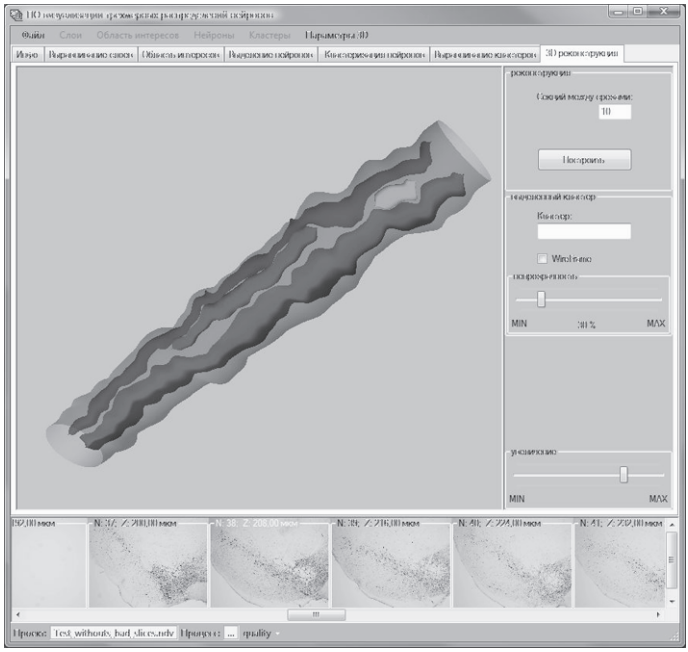


Рис. 8. Интерфейс модуля «3D-реконструкция»

нейродегенеративных заболеваний. И это в первую очередь связано с разработкой новых алгоритмических методов анализа данных и синтеза обобщенных способов их графического изображения, с учетом сложившихся на сегодняшний день нейробиологических представлений.

По результатам работы над проектом к настоящему моменту:

– разработана методология реконструкции трехмерного распределения нейронов по данным их распознавания в изображениях серийных срезов головного мозга;

– адаптирован к задаче выделения контуров распределения нейронов в срезах алгоритм кластеризации, основанный на известном EM-методе (оценивание–максимизация);

– разработана полиномиальная межслойная аппроксимация параметров двумерных контуров кластеров с целью уменьшения количества срезов для трехмерной реконструкции плотности нейронов;

– разработано экспериментальное программное обеспечение ВТРН;

– в ПО включена возможность использования выходных данных программных комплексов автоматического распознавания нейронов по изображениям срезов мозга.

Литература

Мандель И.Д. Кластерный анализ. М.: Финансы и статистика, 1988. С. 98-117.

Обухов Ю.В., Анциперов В.Е. и др. Система распознавания нейронов и реконструкции их трехмерного распределения по цифровым изображения срезов черной субстанции и стриатума мозга экспериментальных животных // Тезисы Всероссийской конференции «Проведение научных исследований в области обработки, хранения и защиты информации». М., 2011. С. 97-99.

Роджерс Д., Адамс Дж. Математические основы машинной графики. М.: Мир, 2001. С. 296-310.

Угрюмов М.В. Новые представления о патогенезе, диагностике и лечении нейродегенеративных заболеваний // Вестник РАМН. 2010. № 8. С. 6-19.

AlbinR.L., Young A.B., Penney J.B. The functional anatomy of basal ganglia disorders // Trends Neurosci. 1989. Vol. 12. P. 366-375.

Gurevich I.B., Kozina E.A., Myagkov A.A, Ugryumov M.V., Yashina V.V. Automating extraction and analysis of dopaminergic axon terminals in images of frontal slices of the striatum // Pattern Recognition and Image Analysis: Advances in Mathematical Theory and Applications. 2010. № 20. Vol. 3. P. 349-359.

Gurevich I.B, Beloozerov V., Myagkov A., Sidorov Yu., Trusova Yu.. Systems of neuron image recognition for solving problems of automated diagnoses of neurodegenerative diseases // Pattern Recognition and Image Analysis: Advances in Mathematical Theory and Applications. 2011. № 21. Vol. 3. P. 392-397.

Neal R., Hinton G. A view of the EM algorithm that justifies incremental, sparse, and other variants // Learning in Graphical Models. Ed. M.I. Jordan. Cambridge, MA: MIT Press, 1999. P. 355-368.

Park H. An approximate lofting approach for B-spline surface fitting to functional surfaces // The International Journal of Advanced Manufacturing Technology. 2001. Vol. 18. № 7. P. 474-482.

*Piegl L., Tiller W. T*he NURBS book. Berlin etc.: Springer, 1997.

Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A., Kucheryanu V.G., Bocharov E., Kryzhanovsky G. et al. Modeling of presymptomatic and symptomatic stages of parkinsonism in mice // Neuroscience. 2011. Vol.181. P. 178-188.

Электронный ресурс.

http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2007/pr04/ru/ По данным доклада ВОЗ, неврологическими нарушениями страдают миллионы людей во всем мире. Брюссель, Женева, 2007.

http://contests-mon.informika.ru/lot/8509/ Открытые конкурсы Минобрнауки России на размещение заказов, информация о лоте, 2011.

Компьютерный метод объективизации головокружения и дифференциации вестибулопатий разного генеза

Л.Н. Корнилова, Г.А. Екимовский, Е.В. Хабарова, Д.О. Глухих, И.А. Наумов, В.Н. Сагалович, Е.Г. Филатова, В.И. Федорова

Адекватность ориентации в пространстве обеспечивается взаимодействием сенсорных систем, прежде всего вестибулярной, зрительной, проприоцептивной и тактильно-опорной. Главную роль играют вестибулярные рецепторы, которые, воспринимая линейное, угловое ускорения и изменения силы тяжести, контролируют положение головы и тела в пространстве. Вся информация от сенсорных систем интегрируется в центральной нервной системе (ЦНС) и модулируется активностью ретикулярной формации, экстрапирамидной системой мозга, мозжечка и лобно-височными долями больших полушарий головного мозга (Цимерман, 1974; Шахнович, 1974; Шульговский, 1997). Важнейшими клиническими признаками поражений вестибулярного анализатора, вестибулярных путей и их связей с другими системами в ЦНС являются развитие головокружения (ГК) и нарушения равновесия (НР).

ГК и НР – одни из наиболее распространенных жалоб, которые пациент предъявляет как врачам общей практики, так и врачам различных специальностей – оториноларингологу, неврологу, психиатру, терапевту и др. Частота этих жалоб составляет до 30% от всех жалоб. ГК – всего лишь симптом, он может быть проявлением различных заболеваний, как не представляющих серьезных угроз здоровью, так и значительно снижающих качество жизни пациента или даже угрожающих его жизни. В связи с этим ГК и НР может из медицинской проблемы перерасти в социальную, поскольку является одной из основных причин инвалидизации населения.

ГК относится к сфере субъективных ощущений человека, что обуславливает трудности описания и определения этого феномена больными.

Существует несколько подходов к классификации ГК (Благовещенская, 1990; Мельников, 2000; Морозова, 2003; Парфенов и др., 2011; Филатова, 2005; Dix et al., 1987; Oosterveld, 1991; Trinus et al., 2008). В соответствии с общепринятой феноменологической классификацией, выделяют вестибулярное головокружение (истинное, системное ГК, вертиго), обусловленное органическим поражением вестибулярной системы. Данный тип ГК достаточно четко описывается больными как внезапное ощущение вращения собственного тела или окружающих пред-

---

Сокращения: АПК – аппаратно-программный комплекс; БФ – быстрая фаза; Впер – периферическая вестибулопатия; ВПсих – психогенная вестибулопатия; ВР – вестибулярная реактивность; ВЦен – центральная вестибулопатия; ГК – головокружения; куПС – коэффициент усиления ПС; кэФС – коэффициент эффективности саккад; МФ – медленная фаза; НР – нарушения равновесия; ПС – плавное слежение; РОКС – ретинальная оптокинетическая стимуляция; СДГ – спонтанные движения глаз; СФГ – следящая функция глаз; ФС – фиксационные саккады; ЦНС – центральная нервная система; ЭОГ – электроокулограмма.

метов. Второй тип головокружения – несистемное. Причины его возникновения лежат вне вестибулярной системы. При этом виде ГК пациенты часто описывают неустойчивость и пошатывание при ходьбе, чувство дурноты и приближающегося страха потери сознания, страха падения, иллюзорное восприятие положения тела в пространстве, предобморочные состояния, «ощущение повело в сторону». Подобные симптомы часто сопровождаются страхом пациента перед нахождением в общественных местах, общественном транспорте и местах скопления людей. Последние варианты так называемых «несистемных» ГК преобладают в клинической практике и представляют огромную трудность для достоверной диагностики, так как данный тип ГК, в отличие от вестибулярного (истинного вертиго), не имеет четких клинических маркеров и способов надежной параклинической верификации. Известно, что несистемное ГК может являться и одним из серьезнейших симптомов фобического и/или невротического расстройства, расстройств сердечной деятельности (нарушение ритма сердца, ишемическая болезнь), гипертонических кризов, ортостатической неустойчивости и многих других сопутствующих сердечно-сосудистых заболеваний.

Таким образом, актуальной проблемой является объективизация жалоб на ГК и НР и предварительная, оперативная дифференциальная диагностика вестибулопатий разного генеза.

В настоящее время выделяют три основных типа вестибулопатий: центральная (ВЦен), периферическая (ВПер) и психогенная (ВПсих).

ВПер возникает при поражении вестибулярного анализатора на периферическом уровне, когда поражаются сенсорные элементы ампулярного и макулярного аппаратов и преддверия, а также вестибулярного ганглия. К периферическим поражениям вестибулярного анализатора относятся функциональное ГК (укачивание), доброкачественное позиционное ГК, гидропс лабиринта, синдром или болезнь Меньера, вестибулярный нейронит (Мельников, 2000; Морозова, 2003; Парфенов и др., 2011; Dix et al., 1987; Oosterveld, 1991).

ВЦен возникает при повреждении связей вестибулярных ядер в стволе мозга с вестибуло-мозжечком, ретикулярной формацией, ядрами глазодвигательных нервов и с корой головного мозга. Причинами поражения центрального отдела вестибулярного анализатора могут быть самые различные заболевания головного мозга (Благовещенская, 1990; Голубев, Вейн, 2002; Шахнович, 1974; Brandt, 1991; Dix et al., 1987; Brodal et al., 1962), преимущественно сосудистого характера.

Вестибулопатия психогенной природы (ВПсих), как правило, возникает за периодом пережитого страха или эмоционального стресса и сопровождается ГК, которое имеет несистемный характер. Кардинальным клиническим признаком психогенного ГК является сочетание с расстройствами в других системах (полисистемность), что указывает на его вторичный психосоматический (вегетативный) характер. При ВПсих отсутствуют объективные клинические и параклинические признаки органической патологии.

Однако в клинической практике нередко ГК носит смешанный характер. Например, приступ вестибулярного ГК в результате доброкачественного пароксизмального позиционного ГК возникает у эмоционального, тревожного и мнительно-

го человека и с течением времени проходит. Однако данный приступ явился стрессом, в результате которого у этого пациента впоследствии развивается несистемное психогенное головокружение, которое продолжается месяцы и годы. Другой пример: у человека с хронической ишемией мозга возникает тревожно-депрессивное расстройство, в результате чего усиливается ГК, он отмечает неустойчивость и пошатывание при ходьбе, появляется страх упасть, он перестает самостоятельно выходить из дома. В этом случае определить причину ГК клиническими методами по жалобам пациентов крайне сложно, а наличие сосудистой патологии не исключает присоединение психогенного расстройства. В таких случаях необходим простой метод, позволяющий определить вклад органических и психогенных нарушений в контроль равновесия у человека.

Индикатором состояния вестибулярной и центральной нервной системы являются адекватные глазодвигательные реакции, характеристики зрительного слежения, восприятия и ориентации в пространстве. Состояние глазодвигательной системы определяется активностью вестибулярной системы и регулируется сложной иерархией иннервационных механизмов, расположенных на разных уровнях ЦНС (Цимерман, 1974; Шахнович, 1974; Шульговский, 1997; Brodal et al., 1962; Buttner, Buttner-Ennever, 1988; Leigh, Zee, 1999). Столь обширное представительство иннервационных механизмов двигательного аппарата глаз в ЦНС приводит к неминуемому возникновению самых различных нарушений движений глаз при очаговых, диффузных и отчасти функциональных поражениях мозга. Точность регистрации различных форм движений глаз и знание иннервационных механизмов реализации этих движений позволяют объективизировать субъективные жалобы пациентов и диагностировать участие определенных систем в развитии этих нарушений (мозжечка, ретикулярной формации, глазодвигательных центров, стволовых структур и т.д.), что на протяжении многих десятилетий активно используется врачами при диагностике поражений нервной системы (Благовещенская, 1990; Вейн и др., 2002; Голубев, Вейн, 2002; Dix et al., 1987; Trinus et al., 2012).

В настоящее время актуальной проблемой является дифференциальная диагностика системных (ВЦен и ВПер) и несистемных (психогенных, кардиогенных и др.) ГК. Существующие на данный момент методы диагностики требуют значительных финансовых и временных затрат и могут быть проведены исключительно в специализированных стационарах, имеющих мощное диагностическое оборудование (магнитно-резонансная томография (МРТ), компьютерная томография (КТ), электроэнцефалография (ЭЭГ) и т.д.). В связи с этим возникает необходимость разработки более быстрых и менее финансово-затратных способов объективизации субъективных жалоб на ГК и предварительной дифференциации их причин, в том числе на этапе первичной медицинской помощи.

Поэтому необходимо создание комплексного компьютерного метода, позволяющего объективизировать ГК и дифференцировать вестибулопатии разного генеза, а в случае сочетанной вестибулопатии – вычленять признаки органического и психогенного ГК, что необходимо для выработки наиболее эффективной терапевтической тактики. Наличие ГК смешанного характера предполагает назначение

комплексной терапии, включающей методы и лекарственные препараты, воздействующие как на органические, так и психические причины.

Целью данной работы являлось создание комплексного компьютерного метода объективизации и дифференциации разных типов ГК и вестибулопатий у отдельных индивидуумов, в том числе в досимптомной (субклинической) фазе заболевания и в стадии ремиссии, основанного на регистрации спонтанных, вестибуло- и зрительно-индуцированных движений глаз и классификационном (дискриминантном) анализе.

Для достижения этой цели необходимо было решить следующие задачи:

– определение диагностических критериев для компьютерной дифференциальной диагностики системного и несистемного ГК;

– выявление субклинической вестибулярной дисфункции у формально здоровых индивидуумов, не предъявляющих жалоб на ГК;

– нахождение классификационных (дискриминантных) функций, характерных для клинически различных типов (органических и психогенных) нарушения вестибулярной функции;

– создание комплексного компьютерного метода объективизации состояния вестибулярной системы у отдельных индивидуумов на базе аппаратно-программного комплекса «ОКУЛОСТИМ – КМ».

В исследовании приняли участие 59 пациентов разного пола и возраста, предъявляющих жалобы на периодическое системное ГК и НР, 77 пациентов с жалобами на несистемное ГК и 64 здоровых мужчин. Было проведено оториноларингологическое и клинико-неврологическое обследование всех пациентов и здоровых испытуемых с применением методов инструментальных обследований (МРТ, КТ, ЭЭГ УЗИ и т.д.) и сбора клинико-анамнестических данных. После клинического обследования пациенты были разбиты на пять групп.

Первая группа включала 24 пациента (14 женщин, 10 мужчин) в возрасте от 25 до 64 лет (средний возраст – 47 лет) с периферической вестибулопатией – ВПер (вестибулярный нейронит, гидропс лабиринта, болезнь Меньера и меньероподобный синдром).

Вторая группа – 26 пациентов (15 женщин, 11 мужчин) в возрасте от 25 до 70 лет (средний возраст – 52 года) с центральной вестибулопатией = ВЦен (дисциркуляторная энцефалопатия II–III степени, посттравматическая энцефалопатия, вертебрально-базилярная недостаточность).

Третья группа – 21 пациент (13 женщин, 8 мужчин) в возрасте от 18 до 45 лет (средний возраст – 28 лет) с психогенной вестибулопатией – Впсих. Пациенты этой группы предъявляли жалобы на ГК и НР, но не имели каких-либо органических нарушений со стороны вестибулярного анализатора, что было подтверждено МРТ. Эта категория больных имела те или иные эмоционально-личностные нарушения, такие как тревожно депрессивные, демонстративные, ипохондрические расстройства личности. Для пациентов этой группы характерна агорафобия – боязнь открытого, людного пространства, общественного транспорта, магазинов, что указывает на панические расстройства.

Все больные данной категории имели выраженный синдром вегетативной дистонии, гипервентиляционный синдром. Описанные синдромы и расстройства личности данной группы больных были выявлены с помощью тестов, применяемых на кафедре неврологии ПМГМУ имени И.М. Сеченова (Вейн и др., 2002; Голубев, Вейн, 2002). Эти данные позволили сделать вывод о наличии у данной категории больных психогенной вестибулопатии (ВПсих).

Четвертая группа – 45 больных (30 женщин, 15 мужчин) в возрасте от 40 до 65 лет (средний возраст – 51 год) с ишемической болезнью сердца, аритмией и артериальной гипертензией в различных стадиях, жалующихся на несистемное ГК и НР. Кардиологическая патология у данной группы больных была подтверждена специализированным учреждением, где они прошли полное комплексное обследование.

Пятая группа включала 64 здоровых человека в возрасте 20–45 лет. Данные для этой группы были получены при обследовании как российских космонавтов перед полетом, так и лиц, допущенных к участию в модельных экспериментах. Все эти индивидуумы прошли полное медицинское обследование и были признаны абсолютно здоровыми.

Для валидизации метода использовалась дополнительная контрольная группа из 46 индивидуумов, предъявлявших жалобы на ГК и НР, с известными клиническими диагнозами.

После клинико-инструментальных обследований в медицинских учреждениях больным было проведено обследование (рис. 1) с использованием аппаратно-программного комплекса (АПК) «ОКУЛОСТИМ – КМ» (Корнилова и др., 2007, 2009, 2010, 2013).

Основу АПК «ОКУЛОСТИМ-КМ» составляют:



Рис. 1. Обследование пациента с психогенной вестибулопатией на АПК «ОКУЛОСТИМ-КМ». Исследование точности фиксационных саккад и плавного слежения на фоне зрительных помех (ретинальной оптокинетической стимуляции – РОКС)

– *Персональный компьютер* с двумя мониторами: один для предъявления зрительной стимуляции обследуемому космонавту, второй – для контроля врачом-экспериментатором физиологических реакций обследуемого.

– *Окулотахогониограф* – устройство регистрации: электроокулограф с 3-осевыми акселлерометрическими датчиками и датчиками угловой скорости, позволяющими определять скорость и угол поворота головой, а также усилитель электроокулограмм (ЭОГ), работающий на постоянном токе. Точность определения поворота глаз составляет 0,5°.

– *Джойстик* для регистрации начала, направления, интенсивности и окончания головокружения и других координационных иллюзий.

– *Программно-математическое обеспечение* – компьютерные программы, которые обеспечивают стимуляцию зрительного и вестибулярного сенсорных входов, хранение и обработку регистрируемых сигналов.

На рис. 2А представлен методический прием исследования вестибулярно- индуцированного нистагма при вращении головой в горизонтальной (А) и сагиттальной (Б) плоскостях.

Исследовались: спонтанные движения глаз (СДГ); вестибулярная реактивность (ВР) при вращении головой в горизонтальной и сагиттальной плоскостях; следя-



Рис. 2. Исследование с помощью ОКУЛОТАХОГОНИОМЕТРА

А – вестибуло-окуломоторных реакций; Б – зрительно-индуцированных окуломоторных реакций в отсутствие и на фоне РОКС

щая функция глаз (СФГ) – установка и удержание взора (фиксационные саккады – ФС) и плавное слежение (ПС) в отсутствие и на фоне ретинальной оптокинетической стимуляции (РОКС).

Исследования спонтанных и зрительно-индуцированных окуломоторных реакций проводили при неподвижной голове, фиксированной в вертикальном положении с помощью головодержателя мягкой фиксации (т.н. «воротника Шанса»). Расстояние от экрана монитора до середины переносицы обследуемого (50 см) фиксировали с помощью ленты, обвивающей сзади шею и крепящейся к правому и левому бокам монитора.

СДГ исследовали при центральном положении глазных яблок и их отведениях поочередно вправо, влево, вверх и вниз с закрытыми глазами по голосовой команде. Глаза в каждой позиции удерживались в течение 7 секунд.

СФГ оценивалась по движению взора при слежении за зрительным стимулом. Зрительный стимул – точечная мишень размером около 1° (фовеальный стимул), перемещавшаяся по заданному закону как на безориентирном поле экрана, так и на фоне ретинальной оптокинетической стимуляции (РОКС). РОКС представляла собой отображаемые на фоне экрана монитора разной интенсивности темные пятна (зрительные помехи в виде эллипсов), разные по форме и диаметру, и движущиеся по определенному закону со скоростью ~5–6°/с. СФГ включало исследование точности фиксационных саккад (ФС) и плавного слежения (ПС).

Фиксационные саккады (ФС)

Статические саккады. Серия скачкообразных перемещений точечного стимула в вертикальном и горизонтальном направлениях в диапазоне 20° с удержанием взора на мишени в течение 2 секунд. Число предъявляемых стимулов (саккад) зависело от состояния обследуемого и составляло от 8 до 14 в каждом направлении.

Динамические саккады. Скачкообразные перемещения взора (6–8 саккад) при появлении стимула на краю экрана с последующим слежением за его плавным линейным перемещением в заданном направлении в диапазоне 20° и скачкообразным возвращением глаз в исходную позицию (фовеальный оптокинетический нистагм).

Плавные следящие движения (ПС). Плавные следящие движения глаз за линейным и синусоидальным перемещением стимула с частотой 0,33 Гц по горизонтали и вертикали в диапазоне 20°.

При зрительных тестах – одновременная регистрация движений глаз (точность регистрации ±0,5°) и зрительных стимулов.

При вестибулярных тестах – одновременная регистрация движений глаз и головы (3-осевые акселерометры и датчики угловой скорости с точностью регистрации ±1,0°). Вращения головой осуществлялись с закрытыми глазами в горизонтальной и сагиттальной плоскостях с частотой 0,125 Гц (4–6 циклов вращения головой).

В качестве первичных диагностических критериев использовалась следующая совокупность количественных показателей глазодвигательных реакций:

– для оценки ВР: показатели нистагма (относительная длительность – отношение общей длительности нистагма к продолжительности всего теста, амплитуда быстрой фазы (БФ), скорость медленной фазы (МФ), частота), регистрируемого

при активных вращениях головой (наличие единичных нистагменных ударов (0–15%) свидетельствовало о нормальной ВР, увеличение длительности нистагма более 15% от длительности теста указывало на повышение ВР);

– для оценки СДГ: показатели спонтанного и установочного нистагма при положении глаз в центре и отведениях их по горизонтали и вертикали;

– для оценки ФС: латентное время реакции, коэффициент эффективности саккад (кэФС) – отношение амплитуды движения глаза (саккады) к амплитуде движения стимула, пиковая скорость саккад, общее время реакции установки и удержания взора;

– для оценки ПС: коэффициент усиления ПС (куПС) – отношение скорости движения глаза к скорости движения стимула.

Для каждого показателя оценивались математическое ожидание (M), дисперсия (σ^2), размах варьирования и коэффициент вариации. Полученные данные анализировались с использованием критерия Фридмана (FriedmanANOVA) и непараметрического теста Уилкоксона и U-теста Манна-Уитни с критическим уровнем значимости α=0,05; коэффициентов корреляции Спирмена и Пирсона. Нормальность распределений и гомогенность дисперсий проверялась с помощью критерия Колмогорова-Смирнова/Лиллифора (Lilliefors) и теста Levene (Боровиков, 2005; Ким и др., 1989).

Для определения диагностически значимых параметров сравнивались выборки, соответствующие одному и тому же показателю одного и того же компьютерного теста, но относящиеся к пациентам, страдающим разными типами вестибулопатий. Также была исследована связь нарушений различных показателей глазодвигательных реакций внутри одного типа вестибулопатии с характером головокружения. Все данные, полученные при обследовании пациентов, сопоставлялись не только между группами, но и с референтными значениями (нормой), которые были получены ранее при обследовании 64 здоровых мужчин в возрасте от 20 до 45 лет.

В работе был использован дискриминантный анализ (Ким и др., 1989), позволивший построить классификационные функции, по значениям которых можно определить, в какую из групп следует отнести индивидуума с известным набором диагностически значимых параметров. Было выделено 6 параметров (диагностических критериев), на основании которых возможно классифицировать патологии вестибулярного аппарата в зависимости от происхождения нарушения. Далее были определены 3 линейные функции, позволяющие отнести испытуемого с известным набором параметров (полученных в ходе обследования) к одной из 3 типов патологий вестибулярного аппарата (периферического, психогенного, церебрального генезов) или к группе здоровых людей. При этом классификационные функции имеют вид: F=var1*coef1+var2*coef2+…+var6*coef6

Статистический анализ данных осуществлялся с использованием прикладных математических пакетов SPSSStatistics и Matlab.

Результаты (M±σ) статистической обработки исследуемых спонтанных, вестибулярно- и зрительно-индуцированных глазодвигательных реакций у 3 групп пациентов и группы здоровых испытуемых представлены в табл. 1.

Как видно из таблицы, у пациентов с ВПер, ВЦен и ВПсих показатели достоверно отличаются от показателей здоровых лиц и имеют между собой стати-

стически значимые групповые различия (исключение составляют характеристики СДГ).

Показатели ВР в группах обследуемых пациентов достоверно отличались не только от показателей здоровых людей, но имели и групповые различия. Так, в случае ВПер нистагменные реакции при активном вращении головой в горизонтальной и сагиттальной плоскостях были достоверно более длительными и более выраженными, чем в группах ВЦен и ВПсих. Кроме того, в отличие от ВЦен в группе ВПер отсутствует корреляция между показателями ВР при вращениях головы в горизонтальной и сагиттальной плоскостях. На рис. 3 представлены фраг-

Таблица 1

Показатели спонтанных, вестибулярно- и зрительно-индуцированных глазодвигательных реакций у здоровых и у больных центральной, периферической и психогенной вестибулопатией

Комп, Тест	Показатель реакции	Группы			
		ВПер (24 чел)	ВЦен (26 чел)	ВПсих (21 чел)	Здоровые (64 чел)
СДГ	длительность нистагма, %	3,5 ± 1,5	7,5 ± 2,0	2,7 ± 1,5	–
	частота нистагма, Гц	0,28 ± 0,06	0,20 ± 0,10	0,15 ± 0,13	–
ВР	длительность нистагма, %	19,0 ± 5,0*&	6,0 ± 2,5*	5,0 ± 3,0&	единичные нистагменные удары
	частота нистагма, Гц	0,30 ± 0,10	0,2 ± 0,15	0,25 ± 0,17	–
	амплитуда БФ нистагма, град	5,0 ± 2,0	3,0 ± 2,0	2,5 ± 1,0	–
	скорость МФ нистагма, град/с	36,0 ± 13,0	33,0 ± 15,0	30,0 ± 16,0	–
ФС	латентное время реакции, с	0,16 ± 0,07&*	0,20 ± 0,05*$	0,25 ± 0,06&$	0,16 ± 0,05
	кэФС	0,85 ± 0,10&*$	0,71 ± 0,12*$	0,70 ± 0,15&$	0,98 ± 0,03
ФС на фоне РОКС	латентное время реакции, с	0,18 ± 0,06&*	0,20 ± 0,07*$	0,22 ± 0,07&$	0,15 ± 0,05
	кэФС	0,75 ± 0,10&*@$	0,65 ± 0,05#*@$	0,83 ± 0,13&#@$	0,97 ± 0,05
ПС	латентное время реакции, с	0,11 ± 0,03&$	0,18 ± 0,08*$	0,20 ± 0,06&	0,20 ± 0,04
	куПС	0,84 ± 0,09*&$	0,76 ± 0,18*$	0,75 ± 0,11&$	0,98 ± 0,03
ПС на фоне РОКС	латентное время реакции, с	0,11 ± 0,05&$	0,16 ± 0,06#$	0,19 ± 0,06&#	0,20 ± 0,05
	куПС	0,76 ± 0,12*&@$	0,67 ± 0,11*#@$	0,89 ± 0,09&#@$	0,97 ± 0,04

Статистически значимые отличия показателей (p< 0,05) между: * – ВПер и ВЦен; & – ВПер и ВПсих; # – ВЦен и ВПсих; @ – в отсутствие и на фоне РОКС; $ – отличия от группы здоровых (от нормы)

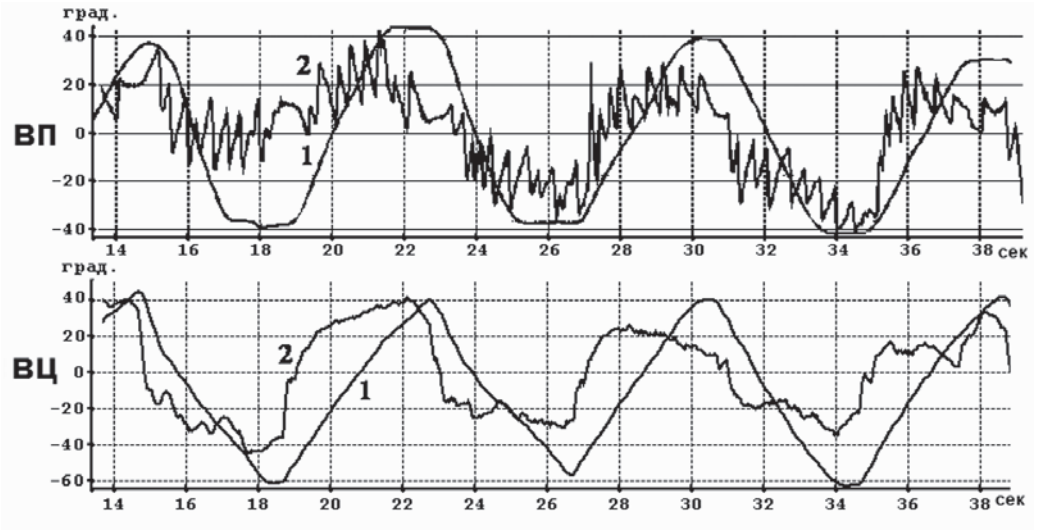


Рис. 3. Фрагменты глазодвигательных реакций при активных вращениях головой вокруг продольной оси тела у больных периферической (ВП) и центральной (ВЦ) вестибулопатией

1 – движение головы, град.; 2 – движение глаз (ЭОГ), град.

менты вестибулярно-индуцированных глазодвигательных реакций (вестибулярная реактивность) при активных вращениях головой вокруг продольной оси тела у больных ВПер и ВЦен.

Величина латентного времени ФС при слежении за скачкообразным перемещением мишени-стимула как в отсутствие, так и на фоне РОКС в случае ВПер статистически значимо ниже, чем у пациентов других групп. В группе ВПер кэФС был статистически значимо выше, чем в группах ВЦен и ВПсих, что свидетельствовало о большей точности установки взора (близкой к физиологической норме) у больных с периферической вестибулопатией. На рис. 4 представлены фрагменты установки и удержания взора на мишени (фиксационные саккады) и плавных движений глаз при слежении за линейнообразным перемещением стимула у больных ВПер и ВЦен.

Статистически значимые различия латентного времени ПС были выявлены только между здоровыми и пациентами ВПер и ВЦен. По сравнению со здоровыми куПС у всех пациентов был достоверно ниже, особенно у ВЦен и ВПсих.

Необходимо отметить, что в группе пациентов ВЦен значимые нарушения ПС сопровождаются (коэффициент корреляции $k=0,7…0,9$, $p<0,001$) четко выраженными нарушениями ФС.

Использование РОКС в случае ВЦен дополнительно ухудшает все формы зрительного слежения, корреляционная связь между нарушениями ПС и ФС в этой группе стремится к 1,0. В группе ВЦен наблюдается значимая прямая (положительная) корреляция ($k=0,7$, $p<0,001$) между состоянием ВР при вращениях головы в горизонтальной и сагиттальной плоскостях.

Таким образом, установлено, что для ВПер характерны повышенная ВР и близкие к норме показатели СФГ. Для больных ВЦен и ВПсих показатели ВР были

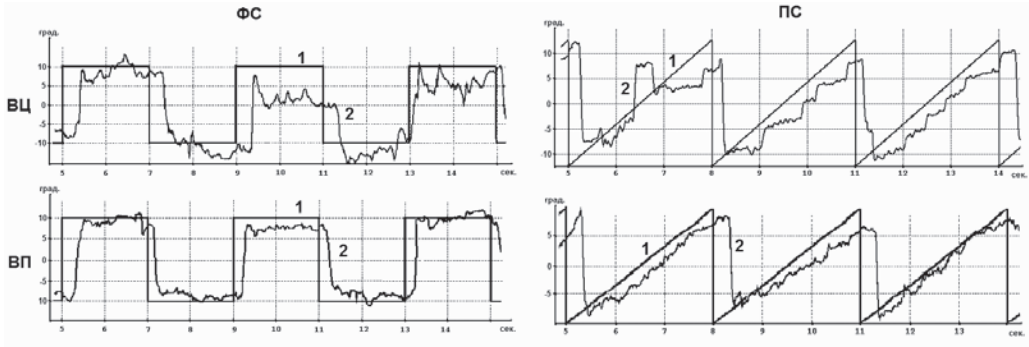


Рис. 4. Фрагменты зрительного слежения у больных периферической (ВП) и центральной (ВЦ) вестибулопатией. ФС – фиксационные саккады, ПС – плавное слежение

1 – движение зрительной мишени (стимула), град.; 2 – движение глаз (ЭОГ), град.

близки к норме. Что касается показателей зрительного слежения, то в группах ВЦен и ВПсих они были достоверно хуже, чем у больных с ВПер. Дополнительная зрительная стимуляция (РОКС) резко ухудшала все исследуемые показатели зрительного слежения у больных ВПер и ВЦен, тогда как в случае с ВПсих показатели зрительного слежения значимо улучшались, о чем свидетельствуют не только данные таблицы, но и характер нативных кривых у больных до и на фоне РОКС. На рис. 5 представлены фрагменты нативных кривых при слежении за линейнообразным движением стимула у больных с органической (ВПер) и психогенной (ВПсих) вестибулопатии.

Сопоставление показателей ФС и ПС у пациентов в отсутствие и на фоне РОКС показало значимость этого теста для дифференциации ВПсих от органических вестибулопатий. Другими словами, сравнительный анализ характеристик зрительного слежения в отсутствие и на фоне РОКС позволяет дифференцировать психогенную и органическую форму вестибулопатий.

Необходимо отметить, что группа пациентов с ВПсих, которая по данным клинического обследования и МРТ не имела каких-либо органических нарушений со стороны вестибулярной системы, демонстрировала при сопоставлении с группой здоровых лиц достоверные различия в исследуемых показателях, особенно в показателях зрительного слежения (кэФС и куПС) в отсутствие и на фоне РОКС.

Полученные результаты свидетельствуют, что изменения в периферической части вестибулярного анализатора не оказывают существенного влияния на центральные иннервационные механизмы движений глаз, и поэтому характеристики зрительного слежения, как правило, соответствуют референтным (физиологически нормальным) значениям.

При ВЦен страдают различные центральные уровни, иннервирующие движения глаз. В зависимости от характера патологии и вовлеченности определенного морфологического субстрата в группе с ВЦен регистрируются характерные для той или иной патологии нарушения в спонтанных и зрительно индуцированных саккадических и плавных следящих движениях глаз.

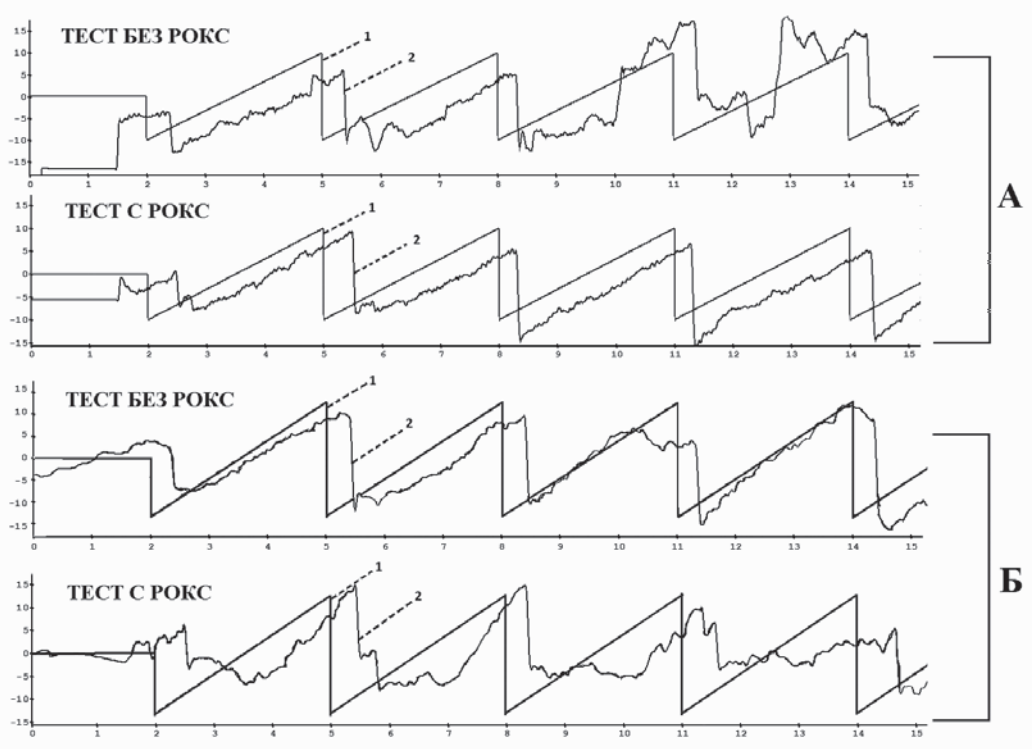


Рис. 5. Фрагменты нативных кривых при слежении за линейнообразным движением стимула при отсутствии и на фоне РОКС у больных с психогенной (А) и органической (Б) вестибулопатией
1 – запись движения стимула, 2 – запись электроокулограммы

В группе ВПсих в отсутствие и на фоне РОКС регистрируемые изменения ФС и ПС не коррелируют между собой и менее выражены, чем в случае органической (центральной и периферической) вестибулопатии. Кроме того, у больных ВПсих наблюдается значимая корреляция между характеристиками СДГ и ВР ($k=0,9$, $p<0,001$), которая отсутствовала в случае органических нарушений.

Сопоставление показателей ФС и ПС у пациентов в отсутствие и на фоне РОКС показало значимость этого теста для дифференциации ВПсих от органических вестибулопатий, то есть, по сути, позволяет рассматривать РОКС как дифференциально-диагностический инструмент.

Значимость оптокинетических стимулов в характере ФС и ПС убедительно подтверждается нейрофизиологическими исследованиями (Barmin et al., 1983; Cohen et al., 1981; Guedry et al., 1979), указывающими на прямое участие зрительных сигналов в модуляции ответов вестибулярных ядер (Brodal et al., 1962; Buttner, Buttner -Ennever, 1988; Leigh, Zee, 1999). Исследования, проведенные с использованием оптокинетической стимуляции, показали, что оптокинетические раздражения адресуются вестибулярным ядрам и участвуют в формировании следящей функции глаз (Buttner, 1988; Leigh, Zee, 1999). В работах (Cohen, Henn, 1972; Guedry et al., 1979) было показано, что слежение у здоровых людей проходит существенно луч-

ше при наличии зрительной фоновой среды, чем без нее. Однако при повреждении вестибуло-мозжечковых синергий и нарушении вестибуло-ретикулярных связей наблюдается совершенно обратная картина: слежение существенно ухудшается на фоне РОКС (Dix et al., 1987; Guedry et al., 1979).

Можно предположить, что у обследованных нами пациентов с диагнозом ВПсих имела место сенсорная депривация, приводящая к понижению уровня спонтанной нейрональной активности вестибулярного ядерного комплекса, и поэтому дополнительные сенсорные стимулы в виде РОКС, воздействуя на вестибулярные ядра и другие интегративные структуры мозга и активизируя их, улучшали характеристики следящей функции глаз (Корнилова и др., 2004; Barmin et al., 1983).

Для определения принадлежности обследуемого к той или иной группе вестибулопатий в работе использовался известный метод математической статистики – дискриминантный анализ (Ким и др., 1989), который позволяет разработать алгоритм решения задач различения (дискриминации) объектов наблюдения по определенным признакам (дискриминантным переменным). В нашем случае такими переменными являются латентное время, коэффициенты эффективности (кэ) и усиления (ку) ФС и ПС на фоне и в отсутствие РОКС, которые и использовались для построения классификационных (дискриминантных) функций.

Классификационные функции имеют вид: $F=b_1*x_1+b_2*x_2+\ldots+b_6*x_6$, где $b_{1,\ldots}b_6$ – коэффициенты, определяемые с помощью дискриминантного анализа, x_1, x_2, x_3 – кэФС, куФС, латентное время ФС, x_4, x_5, x_6 – кэПС, куПС, латентное время ПС. Число этих функций определяется количеством исследуемых групп.

Результаты классификации обследованных групп представлены в табл. 2.

Из таблицы видно, что наибольший процент правильной классификации (95,5%) наблюдается для группы здоровых субъектов. В этой группе только 3 субъекта (0,5%) были причислены к группе ВПсих. Наименьший процент точности классификации (71,4%) имелся в группе ВПсих, так как около 30% обследованных из этой группы по данным дополнительного клинического инструментального обследования имели и органическую, преимущественно центральной природы, вестибулопатию.

Таблица 2

Результаты классификации обследованных групп

Классификация и группы		Предсказанная принадлежность к группе, чел.				Всего в группе, чел.
		ВЦен	ВПер	ВПсих	Здоровые	
Результаты классификации	ВЦен	22	2	2	–	26
	ВПер	2	20	2	–	24
	ВПсих	5	1	15	–	21
	здоровые	–	–	3	61	64
Частота правильной классификации, %	ВЦен	84,6	–	–	–	
	ВПер	–	83,3	–	–	
	ВПсих	–	–	71,4	–	
	здоровые	–	–	–	95,5	

Для валидизации предложенного метода были дополнительно обследованы на АПК «ОКУЛОСТИМ-КМ» 46 пациентов, чьи клинические диагнозы были известны по результатам нейровизуальных и клинико-инструментальных обследований с применением МРТ. При этом на первом этапе с помощью дискриминантного анализа определялись группы индивидуумов с органическим (ВЦен и ВПер), с психогенным (ВПсих) поражением и здоровые. Затем в группе с органическим поражением вестибулярной системы проводилась дополнительная дифференциация индивидуумов с ВЦен и ВПер.

Точность классификации для здоровых лиц составила 95,5%, для групп больных с органической вестибулопатией – 81% (внутри этой группы точность для ВПер – 88,9%, для ВЦен – 81,6%), для группы ВПсих точность классификации составила 70,8%.

Разработанные диагностические критерии и классификационные функции были применены для анализа кардиогенных больных, предъявляющих жалобы на несистемное ГК и НР. Впервые проведенный дискриминантный анализ и сопоставление больных, страдающих системными (вестибулярными) и несистемными (кардиогеннными) ГК и НР, показал, что у кардиогенных больных они обусловлены развитием сопутствующих вестибулопатий психогенной (37,5%) и центральной (церебральной) (62,5%) природы. Диагностических критериев, специфических для кардиогенных больных, предъявляющих жалобы на головокружение несистемного характера, выявлено не было.

Разработанные диагностические критерии и классификационные функции были также успешно применены для анализа космонавтов, предъявляющих жалобы на системное и несистемное головокружение и нарушение равновесия после длительных космических полетов. Впервые было показано, что у 14% космонавтов ГК и НР, развивающиеся в первые сутки реадаптации, обусловлены нарушениями функционирования периферической части вестибулярного анализатора, у 75% космонавтов – развитием психогенной вестибулопатии, а у 11% наблюдались ГК и НР невестибулярной природы.

Проведенные исследования показали, что дискриминантный анализ дает возможность отнести обследуемого с известным набором диагностических показателей, полученных с помощью АПК «ОКУЛОСТИМ-КМ», к той или иной группе больных вестибулопатией. В итоге были разработаны алгоритм и комплексный компьютерный метод (АПК «ОКУЛОСТИМ – КМ) для *предварительной* дифференциальной диагностики характера ГК и типа вестибулопатии у каждого отдельного больного в досимптомной (субклинической) фазе заболевания без привлечения дополнительных клинико-инструментальных средств обследования.

Можно отметить как основные следующие результаты выполненной работы:

1. Для объективизации жалоб пациентов на головокружение и нарушение равновесия определены достоверные диагностические показатели, основанные на регистрации и анализе спонтанных, вестибулярно- и зрительно-индуцированных движений глаз. Ими оказались коэффициенты эффективности (кэ) и усиления (ку) ФС и ПС на фоне и в отсутствие РОКС.

2. На основе полученных диагностических показателей построены классификационные (дискриминантные) функции, позволяющие диагностировать здоровых субъектов и субъектов с клинически различными типами нарушений вестибулярной функции: периферической, центральной и психогенной вестибулопатией.

3. Разработан комплексный компьютерный метод для дифференциации вестибулопатий разного генеза у отдельного индивидуума в досимптомной (субклинической) фазе заболевания и в стадии ремиссии, основанный на классификационном (дискриминантном) анализе диагностических показателей.

4. Проведенное сопоставление результатов компьютерной диагностики с известными клиническими диагнозами по результатам нейровизуальных и клинико-инструментальных обследований с применением МРТ, КТ и ЭЭГ показало их хорошее совпадение.

Представленная работа продемонстрировала, что клиническая практика ставит новые задачи, решение которых необходимо прежде всего в области сочетанных вестибулопатий и смешанных ГК. В случае диагностирования сочетанной вестибулопатии и развития смешанного характера ГК актуальнейшим становится вопрос о выделении сопутствующего органической вестибулопатии психогенного фактора. Известно, что в клинической практике очень часто ГК носит смешанный характер. Психогенное ГК может иметь как первичный, так и вторичный характер. Приступ вестибулярного ГК, возникший первый раз у эмоционального, тревожного и мнительного человека, впоследствии может перманентно сопровождать его многие годы, сопутствуя другим патологиям. У человека с хронической ишемией мозга возникает тревожно-депрессивное расстройство, что приводит к усилению и изменению типа ГК. В этом случае определить причину ГК клиническими методами крайне сложно, т.к. наличие сосудистой патологии не исключает присоединение психогенного расстройства. Поэтому для таких случаев необходим поиск новых критериев дифференциации и расширение арсенала методических приемов, в частности – поиск новых дискриминантных (классификационных) функций, позволяющих оценить вклад органических и психогенных нарушений в контроль равновесия у человека. Получение новых дифференциальных критериев и создание новых классификационных функций позволит в дальнейшем определять признаки органического и психогенного ГК, что имеет важное прикладное значение для проведения наиболее эффективной терапии. Наличие ГК смешанного характера предполагает назначение комплексной терапии, включающей методы и лекарственные препараты, воздействующие как на органические, так и психические причины заболевания.

Литература

Благовещенская Н.С. Отоневрологические симптомы и синдромы. М.: Медицина, 1990. 432 с.

Боровиков В.П. Искусство анализа данных, 2-е издание. СПб.: ПИТЕР, 2005.

Вейн А.М., Вознесенская Т.Г., Воробьева О.В. и др. Неврология для врачей общей практики. Ред. А.М. Вейн. Изд. 2-е, доп. М.: Эйдос Медиа, 2002. 432 с.

Голубев В.Л., Вейн А.М. Неврологические синдромы. М., 2002. С. 695-704.

Ким Дж.-О., Мюллер Ч.У., Клекка У.Р. Факторный, дискриминантный и кластерный анализ. Пер. с англ. М.: Финансы и статистика, 1989. 216 с.

Корнилова Л.Н., Соловьева А.Д., Темникова В.В., Саранцева А.В., Стефанков Д.В. Компьютерные тесты для исследования глазодвигательных реакций у больных с жалобами на головокружение // Журнал неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. 2004. Т. 104. № 5. С. 34-41.

Корнилова Л.Н., Сагалович С.В., Алехина М.И., Козловская И.Б. Компьютерный способ комплексной оценки состояния вестибулярной функции, межсенсорных взаимодействий и следящей функции глаз. Патент № 2307575 от 10.10.2007.

Корнилова Л.Н., Наумов И.А., Азаров К.А., Темникова В.В. и др. Компьютерный способ комплексного отоневрологического обследования и нефармакологической коррекции вестибуло-сенсомоторных нарушений // Вестник оториноларингологии. 2009. № 1. С. 28-33.

Корнилова Л.Н., Наумов И.А., Карлицкий Н.Н., Екимовский Г.А., Соловьева А.Д., Доценко В.И., Слива С.С. Компьютерные методы в диагностике головокружений и нарушений равновесия // Известия ЮФУ. Технические науки. Тематический выпуск «Медицинские информационные системы». 2010. Т. 109. № 8. С.215-221.

Корнилова Л.Н., Наумов И.А., Екимовский Г.А., Карлицкий Н.Н., Дрынкина Е.В., Соловьева А.Д., Федорова В.И. Дифференциальная диагностика центральной и периферической вестибулопатий по показателям глазодвигательных реакций // Журнал неврол. и псих. им. С.С. Корсакова. 2013. № 2. С. 39-53.

Мельников О.А. Некоторые аспекты диагностики и лечения головокружения // Леч. врач. 2000. Вып. 9. С. 1-4.

Морозова С.В. Головокружение в практике врача-интерниста // Кардиоваск. тер. и проф. 2003. Вып. 1. С. 105-10.

Парфенов В.А., Замерград М.В., Мельников О.А. Головокружение (диагностика и лечение, распространенные диагностические ошибки). М.: МИА, 2011. 174 с.

Филатова Е.Г. Тревога в неврологической практике // Леч. нервн. бол. 2005. Вып. 1. С. 7-14.

Цимерман Н.С. Ухо и мозг. М.: Медицина, 1974. 203 с.

Шахнович А.Р. Мозг и регуляция движений глаз. М.: Медицина, 1974. 160 с.

Шульговский В.В. Физиология центральной нервной системы. М.: МГУ, 1997. 397 с.

Barmin V.A., Kreidich Yu.V., Kozlovskaya I.B. Influence of optokinetic stimulation and immersion on eye-head coordination in man // The physiologist. 1983. Vol. 26. № 6. C. 83-85.

Brandt T. Vertigo: its multisensory syndromes. London: Springer-Verlag, 1991. 329 p.

Brodal A., Pompeiano O., Walberg F. The vestibular nuclei and their connections // Anatomy and Functional Correlations. Edinburg: The William Ramsay Henderson Trust, Oliver and Boyd, 1962. (Бродал А., Вальберг Ф., Помпеано О. Вестибуляр. ядра. Связи, анатомия, функциональные корреляции М.: Наука, 1966., перевод с англ.)

Buttner U., Buttner-Ennever J. Present concepts of oculomotor organization, Neuroanatomy of the Oculomotor System. Ed. J. Buttner-Ennever. NY.: Elsevier, 1988. P. 3-23, 119-176.

Cohen B., Henn V. Unit activity in the pontine reticular formation associated with eye movements // Brain Res. 1972. Vol. 46. P. 403-410.

Cohen B., Henn V., Raphan T., Dennett D. Velocity storage, nystagmus, and visual-vestibular interactions in humans // Ann. NY Acad. Sci. 1981. Vol. 374. P. 421-433.

Dix M., Hood J. Vertigo. Chichester–New-York–Brisbane–Toronto–Singapore: John Wiley & Sons, 1987. 471 p.

Guedry F.E., Davenport K.S., Brewton C.B., Turnspeed G.T. The pendular eye tracking test under two background viewing conditions. Naval. Aeroscopic. Medical. Res. Laboratory. Pensacola, Florida, 1979.

Kornilova L., Grigorova V., Mueller Ch. et al. Effects of vestibular and support afferentation upon visual pursuit in microgravity // J. Gravitational Physiology. 2004. Vol. 11. № 2. P. 5-8.

Leigh R., Zee D. The Neurology of Eye Movements, 3rd ed. NY: Oxford University Press, 1999. 611 p.

Oosterveld W.J. Vertigo. Current diagnostic techniques in vestibular disorders // Acta Otolaryngologica. 1991. Vol. 479. P. 29-34.

Trinus K., Claussen C., Barasii S. Vertigo and dizzines: differential diagnostics and individual treatment // Neurootology Newsletter. 2008. Vol. 8. № 2. P. 6-15.

Trinus K., Claussen C., Kornilova L. et al. Guidelines on dizziness and space orientation disorders // Neurootology Newsletter. 2012. Vol. 9. № 1. P. 23-30.

Глава 2

ДИАГНОСТИКА

Позитронная эмиссионная томография в исследованиях рецепторов мозга: дофаминергическая система

Р.Н. Красикова

Содержание

1. Введение
2. Методы получения фтора-18
3. Синтез 6-[^{18}F]-L-ФДОФА методом электрофильного радиофторирования
4. Нуклеофильный синтез 6-[^{18}F]-L-ФДОФА
5. Заключение

1. Введение

Развитие и совершенствование современных методов ядерной медицины – позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ) и однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ), существенно расширило возможности *in vivo* изучения нейрохимических процессов с участием рецепторов и нейротрансмиттеров как в норме, так и при различных патологиях. За последние годы создан целый ряд меченых соединений (рецепторных радиолигандов), специфично связывающихся с отдельными типами и подтипами рецепторов центральной нервной системы (ЦНС), вовлеченных в патогенез различных неврологических и психических заболеваний, таких как паркинсонизм, шизофрения, болезнь Альцгеймера, депрессивный синдром и другие. В этих исследованиях ПЭТ играет ведущую роль ввиду возможности получения количественных данных о плотности и аффинности рецепторов, что необходимо для изучения патогенеза различных заболеваний, обусловленных нарушениями рецепторных и нейротрансмиттерных взаимодействий.

Основы метода, разработанного в 80-е годы прошлого века, описаны в ряде монографий и обзоров (Phelps et al., 1986; Wahl et al., 2002; Lee et al., 2006; McCarthy, 2007). Огромное значение имеет тот факт, что в ПЭТ (в отличие от ОФЭКТ) используются короткоживущие радиоизотопы легких элементов, три из которых – кислород-15 ($T_{1/2}$ 2 мин.), азот-13 ($T_{1/2}$ 9,98 мин.) и углерод-11 ($T_{1/2}$ 20,4 мин.) – являются изотопами жизненно важных биологических элементов. С их помощью можно «пометить» практически любое соединение, критически важное для осуществления определенной функции организма, без изменения его биохимическо-

Сокращения: ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; МФХК – межфазный хиральный катализ; ОФЭКТ – однофотоннаяэмиссионная компьютерная томография; ПЭТ – позитронная эмиссионная томография; РФП – радиофармпрепараты; ЦНС – центральная нервная система; DCBPB – *(S)*-*N*-(2-бензоилфенил)-1-(3,4-дихлобензил)пирролидин-2-карбоксамид; DAT – мембранный транспортер дофамина; L-ДОФА – L-дигидрокисфенилаланин.

го поведения и метаболизма. Четвертый радионуклид этой группы, фтор-18 ($T_{1/2}$ 109,8 мин), не входит в число биогенных элементов, но благодаря близости ван-дер-ваальсовых радиусов фтор замещает атом водорода или гидроксильную группу в молекуле РФП при минимальных структурных изменениях. Введение фтора-18 в структуру молекулы существенно влияет на ее биохимическое поведение; из-за наличия фтора в молекуле на определенном этапе метаболизма происходит его блокировка, и радиотрейсер удерживается в клетке. Благодаря малым периодам полураспада основных радионуклидов ПЭТ обладает высокой чувствительностью и позволяет детектировать исключительно малые количества вводимых РФП по их радиоактивности. На практике для получения высококонтрастного ПЭТ-изображения достаточно вводить сравнительно небольшие активности (дозы) РФП (175 МБк при ПЭТ-исследовании мозга).

Для реализации возможностей ПЭТ прежде всего необходимы радиофармпрепараты (РФП) – биологически активные соединения, в состав которых входят вышеперечисленные и другие ПЭТ-радионуклиды. Ввиду малого периода полураспада ПЭТ радионуклидов (от 2 до 110 мин) их производство осуществляется на медицинском циклотроне, входящем в состав ПЭТ-центра, тогда как для получения РФП нужна современная радиохимическая лаборатория и автоматизированные технологии синтеза, позволяющие безопасно работать с высокими уровнями радиоактивности (Кодина, Красикова, 2014). Для каждого РФП требуется разработка уникальных экспресс-методов синтеза и системы контроля качества, и для решения этой задачи появилась новая область – радиофармацевтика (Кодина, Красикова, 2014; Корсаков, 2002). В связи с необходимостью использования дорогостоящего оборудования, высоких капиталовложений в создание ПЭТ-центра и применения высоких технологий производства РФП в настоящее время ПЭТ считается наиболее дорогостоящим методом медицинской визуализации.

Современный этап развития ПЭТ характеризуется интенсивным использованием РФП на основе наиболее долгоживущего из циклотронных радионуклидов, фтора-18, ядерно-физические характеристики которого практически идеально подходят для ПЭТ. Использование фтора-18 позволяет достичь наиболее высокого пространственного разрешения, что обусловлено низкой энергией испускаемых позитронов (0,635 МэВ) и, соответственно, минимальным пробегом в клетке (2,4 мм). Относительно большой по сравнению с другими циклотронными радионуклидами (^{15}O, ^{13}N и ^{11}C) период полураспада ^{18}F (110 мин) позволяет осуществлять сложные радиохимические синтезы и доставлять РФП на достаточно большие расстояния в клиники, не имеющие собственного циклотронно-радиохимического комплекса. В настоящее время число устанавливаемых ПЭТ-камер намного выше, чем циклотронов, и именно РФП, меченные фтором-18, пользуются наибольшим спросом у клиницистов. Многие из уже известных радиотрейсеров внедрены в клиническую практику, главным образом в онкодиагностику (Cai et al., 2008; Coenen et al., 2010), продолжаются разработки новых РФП, в том числе и для исследований рецепторов мозга.

К достоинствам фтора-18 относится и возможность получения радиотрейсеров без добавления носителя (no carrier added, n.c.a.) с высокой мольной активностью, 1000–10 000 Ки/мМоль. Мольная (удельная) активность является «краеугольным

камнем» использования ПЭТ в исследованиях рецепторов, где количество вводимого в составе РФП нерадиоактивного субстрата должно быть сведено к минимуму (на уровне нано- и пикомолей), с тем чтобы избежать «насыщения» активных мест связывания с рецепторами. В исследованиях новых лекарственных препаратов все более широко применяются ПЭТ-сканеры для мелких лабораторных животных (small animal PET), где, с учетом малой массы животных, высокая удельная активность РФП является определяющей. Одним из первых ПЭТ-рецепторных исследований мозга, опубликованных в 1983 г. в журнале Nature (Garnett et al., 1983), является оценка плотности дофаминергических нейронов с использованием 6-[^{18}F]-L-ФДОФА, меченного фтором-18 фторированного аналога L-дигидроксифенилаланина (L-ДОФА). Большая часть ПЭТ-исследований рецепторов направлена именно на изучение дофаминергической системы, вовлеченной в патологии таких заболеваний, как паркинсонизм, шизофрения (Dagher et al., 2001; Cumming, Gjedde, 1998; Halldin et al., 2001; Lammertsma, Hume, 1996; Laruelle, 2000; Elsinga et al., 2006), а также являющейся объектом воздействия различных лекарственных средств и наркотиков (Volkow et al., 2007). В дополнение к 6-[^{18}F]-L-ФДОФА арсенал ПЭТ-радиолигандов, который продолжает пополняться, включает десятки меченых соединений. Наиболее широко применяются ^{11}C-раклоприд и ^{18}F-фаллиприд (D_2) (Farde, 1986; Farde et al, 1987), ^{11}C-SCH 39166 (D_1) (Farde et al., 1987), ^{11}C-FLB 457 (D_2 extrastriatal area) (Halldin et al., 1995), ^{11}C-PE2I (Halldin et al., 2003) и ^{18}F-PE2I (Schou et al., 2009) (DAT) и многие другие. Для ОФЭКТ исследований DAT разработан ^{99m}Tc-TRODAT-1 на основе генераторного технеция-99m (Huang et al., 2003), а также другое производное тропанов на основе йода-123, DATSCAN, поставляемое на коммерческой основе в Европе (но не в России). Исключительно успешными являются последние разработки по созданию меченных углеродом-11 и в особенности фтором-18 рецепторных радиолигандов (Mason et al., 2013; Rowe, Villemagne, 2011; Någren et al., 2010) для визуализации амилоидных агрегатов – одной из причин болезни Альцгеймера.

2. Методы получения фтора-18

Наиболее распространенным методом получения фтора-18 является ядерная реакция ^{18}O(p,n)^{18}F, реализуемая при облучении воды-^{18}O (обогащение 95–97%) в водной мишени циклотрона протонами средних энергий (Кодина, Красикова, 2014; Корсаков, 2002; Cai et al., 2008; Coenen et al., 2010) (табл. 1). Радионуклид стабилизируется в химической форме ^{18}[F]фторида, пригодной для синтеза РФП методом нуклеофильного радиофторирования, при этом он получается «без добавления носителя» (nocarrieradded), что позволяет получать радиотрейсеры высокой удельной активности. Фтор-18 в газообразной форме [^{18}F]F_2, используемой для введения метки в молекулы по реакции электрофильного фторирования, чаще всего получают облучением газовой мишени, заполненной смесью неона и фтора, дейтонами, по реакции ^{20}Ne(d,α)^{18}F (Blessing et al., 1986), или кислородной газовой мишени, заполненной обогащенным [^{18}O]O_2 (Кодина, Красикова, 2014), в которой [^{18}F]F_2 полу-

Таблица 1

Наиболее распространенные ядерные реакции получения фтора-18 в коммерческих циклотронах (Кодина, Красикова, 2014)

Ядерная реакция	Облучаемое вещество	Химическая форма фтора-18	Сечение, мбарн	Макс. активность	Добавдение носителя
$^{18}O(p,n)^{18}F$	$[^{18}O]H_2O$	$[^{18}F]$фторид	700	до 25 Ки*	Нет
$^{20}Ne(d,\alpha)^{18}F$	Ne (0.5-1% F_2)	$[^{18}F]F_2$	115	300 мКи	Да
$^{18}O(p,n)^{18}F$	$[^{18}O]O_2$	$[^{18}F]F_2$	700	1.3 Ки	Да

* при одновременном облучении двух мишеней током пучка 80 μA в течение двух часов.

чают по ядерной реакции $^{18}O(p,n)^{18}F$ (см. табл. 1).

Нуклеофильное фторирование – наиболее распространенный метод получения различных классов радиотрейсеров (Кодина, Красикова, 2014; Корсаков, 2002; Cai et al., 2008; Coenen et al., 2010); именно он применяется в производстве большинства радиотрейсеров в клинической практике, начиная с $[^{18}F]$ФДГ и других. При получении фтора-18 в газовой мишени необходимо добавление носителя, стабильного $[^{19}F]F_2$, для эффективного извлечения $[^{18}F]F_2$ (эффективность извлечения не превышает 85%). В итоге радиотрейсеры, полученные электрофильным методом, имеют низкую удельную (мольную) активность, и метод не может применяться в синтезе потенциально токсичных фторпроизводных, например 3-$[^{18}F]$фтор-L-тирозина. В целом электрофильный метод не дает возможности получать высокие активности РФП, однако он применяется в тех случаях, когда введение метки в молекулу нуклеофильным методом невозможно или требует многостадийного синтеза.

Классическим примером получения РФП электрофильным методом является синтез фторированных аналогов аминокислот ($[^{18}F]$ФАА), содержащих радиоактивную метку в ароматическом фрагменте, в том числе и важнейшего ПЭТ-радиотрейсера 6-$[^{18}F]$фтор-3,4-L-дигидроксифенилаланина (6-$[^{18}F]$-L-ФДОФА).

3. Синтез 6-$[^{18}F]$-L-ФДОФА методом электрофильного радиофторирования

6-$[^{18}F]$-L-ФДОФА, фторированный аналог L-дигидрокисфенилаланина (L-ДОФА), занимает особое место в группе РФП на основе $[^{18}F]$ФАА ввиду своих диагностических характеристик и широкого спектра диагностического применения. L-ДОФА является эндогенным предшественником дофамина и представляет особый интерес ввиду важной функциональной роли дофамина как основного нейромедиатора центральной дофаминергической нейропередачи. Он играет важную роль в осуществлении двигательных, когнитивных, нейроэндокринных функций, а также участвует в патогенезе ряда нервно-психических заболеваний**:** болезней Паркинсона и Альцгеймера, шизофрении и некоторых других. Однако меченый дофамин не может быть использован в качестве радиотрейсера при ПЭТ, поскольку он не прони-

кает через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и не накапливается в мозге. В свою очередь 6-[^{18}F]-L-ФДОФА легко проникает через ГЭБ, декарбоксилируется L-дофадекарбоксилазой с образованием дофамина, аккумулируемого в дофаминергических нейронах различных участков мозга, главным образом в черной субстанции.

В 1983 г. было впервые предложено использовать 6-[^{18}F]-L-ФДОФА (Garnett et al., 1983) в качестве РФП для изучения дофаминергической системы. Было показано, что использование этого радиотрейсера позволяет получать количественную информацию о плотности дофаминергических нейронов, что чрезвычайно важно для диагностики и выбора тактики лечения болезни Паркинсона и других поражений дофаминергической системы (Barrio et al, 1997; Dagher et al., 2001; Cumming, Gjedde, 1998). Кроме того, как показали недавние исследования, 6-[^{18}F]-L-ФДОФА является эффективным агентом для ПЭТ-диагностики нейроэндокринных опухолей (феохромоцитома, нейробластома), злокачественных новообразований щитовидной железы, опухолей мозга и целого ряда периферических новообразований (Seibyl et al., 2007; Minn et al., 2009). Несмотря на преимущества использования 6-^{18}F-L-FDOPA при ПЭТ, данный РФП применяется всего в нескольких ПЭТ-центрах Европы, что обусловлено трудностями его получения.

В первых работах по синтезу 6-[^{18}F]-L-ФДОФА использовался метод прямого электрофильного радиофторирования «незащищенной» L-ДОФА, что приводило к образованию смеси трех стереоизомеров – 2-, 5- и 6-[^{18}F]-L-ФДОФА (Adam et al., 1986). Однако, как было показано, только 6-[^{18}F]-L-ФДОФА накапливается в черной субстанции, отдела мозга с максимальной плотностью дофаминергических нейронов. Для получения именно этого изомера используют региоселективные методы. Чаще всего применяется реакция дестаннилирования, исходным веществом (предшественником) в которой служит модифицированная молекула аминокислоты, содержащая в 6-ом положении бензольного кольца «уходящую» группу $Sn(CH_3)_3$. Эта группа и замещается на фтор-18 (De Vries et al., 1999) (рис. 1), при этом целевая аминокислота получается с энантиомерной чистотой более 99%. Электрофильный синтез включает всего две стадии (фторирование и снятие «защиты» амино-, карбокси- и гидроксигрупп) и успешно автоматизирован в современных модулях для синтеза РФП для ПЭТ (De Vries et al., 1999).

При кажущейся простоте процесса электрофильный метод синтеза включает много промежуточных стадий, что в сочетании с длительным временем облучения

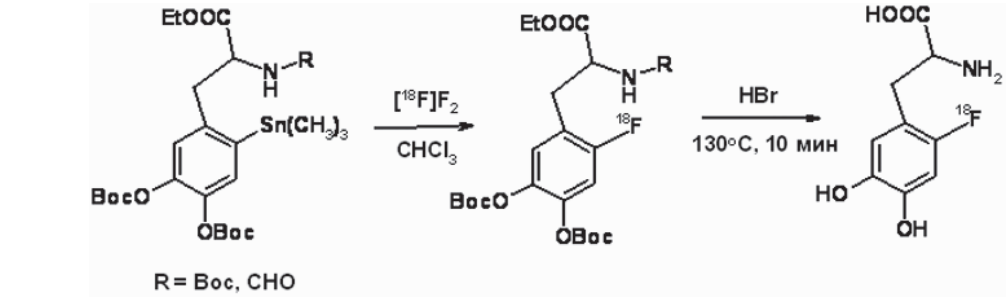


Рис. 1. Электрофильный синтез 6-[^{18}F]-L-ФДОФА с использованием реакции дестаннилирования (deVries et al., 1999)

приводит к очень большому общему времени получения РФП и невысокой активности конечного продукта. В итоге при сравнительно большом радиохимическом выходе продукта (около 40%) приведенный метод синтеза позволяет получить всего 3–4 клинических дозы РФП (2,6 ГБк). Следует отметить, что ввиду использования «станнильного предшественника» необходим тщательный контроль содержания олова в конечном продукте (Fuchtner et al., 2002), поскольку даже при очистке методом ВЭЖХ в продукте могут присутствовать следы этого токсичного металла.

Присутствие носителя (нерадиоактивного фтора) в инъекционной форме 6-[^{18}F]-L-ФДОФА может вызвать карциноидный кризис у пациента, хотя это было отмечено лишь в единичном случае (Koopmans et al., 2005). Для уменьшения количества носителя группой финских исследователей был предложен метод трансформации «безносительного» [^{18}F]фторида в [^{18}F]F_2 с помощью специальной технологии с использованием электрического разряда (Forsback et al., 2008) (рис. 2). При этом на стадии получения электрофильного агента также необходимо добавление носителя, но в существенно меньших количествах по сравнению с концентрацией фтора в газовой мишени. В итоге удельная мольная активность полученного препарата 6-[^{18}F]-L-ФДОФА достигала значений от 2,1 до 6 ГБк/μМоль, что в 3300 раз выше, чем с использованием «традиционного» электрофильного синтеза данного радиотрейсера (0,011±0,002 ГБк/μМоль) (Forsback et al., 2008). Тем не менее, ввиду технических сложностей, связанных с использованием электрического разряда, предложенный метод используется лишь в ПЭТ центре г. Турку, Финляндия.

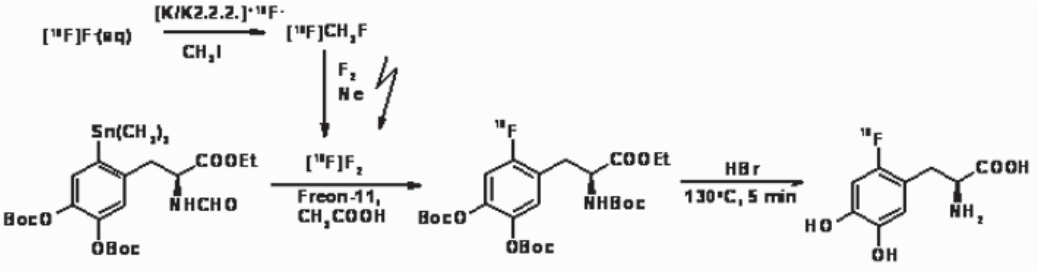


Рис. 2. Электрофильный синтез 6-[^{18}F]-L-ФДОФА с использованием «нуклеофильного» [^{18}F]фторида (Forsback et al., 2008)

В целом, несмотря на недостатки и сложности электрофильного метода, его низкую производительность, приводящую к высокой стоимости единичной клинической дозы 6-[^{18}F]-L-ФДОФА, именно этот метод применяется в большинстве ПЭТ-центров для клинических исследований с данным РФП. Рассмотренные ниже методы получения на основе реакций нуклеофильного фторирования в применении к 6-[^{18}F]-L-ФДОФА являются слишком сложными для автоматизации и использования в рутинной практике ПЭТ.

4. Нуклеофильный синтез 6-[^{18}F]-L-ФДОФА

Наиболее распространенным методом получения РФП на основе фтора-18 является реакция нуклеофильного фторирования (замещения) с использованием [^{18}F]

фторида, прежде всего благодаря простому и удобному методу получения и выделения радионуклида в этой химической форме. Современные циклотроны обеспечивают получение [^{18}F]фторида с высокой радиоактивностью (см. табл. 1) без добавления носителя по ядерной реакции ^{18}O(p,n)^{18}F, реализуемой при облучении воды-^{18}O (обогащение 95–97%) в водной мишени циклотрона. Для перевода ^{18}F из водной в органическую фазу и получения его в форме, активной в реакциях нуклеофильного замещения, были разработаны оригинальные методы, основанные на использовании межфазных катализаторов (Кодина, Красикова, 2014; Корсаков, 2002; Cai et al., 2008; Coenen et al., 2010). Развитие этих работ, выполненных в 80-е годы, дало возможность получения важнейших классов радиотрейсеров на основе фтора-18. Обширный обзор методов нуклеофильного синтеза соединений, меченных фтором-18, с различными функциональными группами, приведен в работе (Coenen et al., 2010). Метод нуклеофильного фторирования применяется для введения фтора-18 как в алифатические, так и в ароматические субстраты. В случае сложных ароматических соединений, таких как ароматические аминокислоты, содержащие фтор-18 в бензольном кольце (в том числе 6-[^{18}F]-L-ФДОФА), прямое введение метки невозможно, поскольку положение «уходящей» группы сильно дезактивировано. В этом случае синтез радиотрейсера проводится в несколько этапов. Вначале фтор-18 вводится в относительно простые молекулы (синтоны), которые обладают высокой реакционной способностью в определенных реакциях.

В синтезе 6-[^{18}F]-L-ФДОФА и других ароматических аминокислот такими синтонами служат замещенные бензилбромиды или бензилйодиды, меченные фтором-18. Меченый галогенид используется в качестве электрофильного агента в реакции асимметрического алкилирования комплексов, содержащих глициновый или аланиновый фрагмент – необходимый «кирпичик» для построения молекулы аминокислоты. Асимметрические методы синтеза, при условии тщательного подбора хирального агента и условий алкилирования, позволяют получать [^{18}F]ФАА с высокой энантиомерной чистотой (более 95%), необходимой для использования в ПЭТ. На рис. 3 приведена схема синтеза 6-[^{18}F]-L-ФДОФА с применением комплекса Ni^{II} основания Шиффа глицина с хиральным реагентом – *(S)*-*N*-(2-бензоилфенил)-1-(3,4-дихлобензил)пирролидин-2-карбоксамидом (DCBPB), разработанного в ИНЭОС РАН, Москва, и использованного в радиохимическом синтезе в ИМЧ РАН, Санкт-Петербург. Высокий выход на стадии алкилирования и высокая стереоспецифичность реакции достигались в условиях, пригодных для автоматизации; метод был автоматизирован с помощью лабораторного робота (Красикова и др., 2007).

В дополнение к этому хорошо известному в органической химии стехиометрическому варианту метода был предложен и метод межфазного хирального катализа (МФХК), который хорошо себя зарекомендовал в синтезе 6-[^{18}F]-L-ФДОФА и 2-[^{18}F]-L-ФТИР. Образование пары катализатор–субстрат в межфазных условиях обеспечивает высокую степень алкилирования и асимметрической индукции. Принципиально важным является тот факт, что в присутствии МФХК процесс алкилирования не требует экстремально низких температур, сильных органических оснований или строго безводных условий, применяемых в первых работах по асимметрическому синтезу [^{18}F]ФАА через стадию образования енолятов (Lemaire

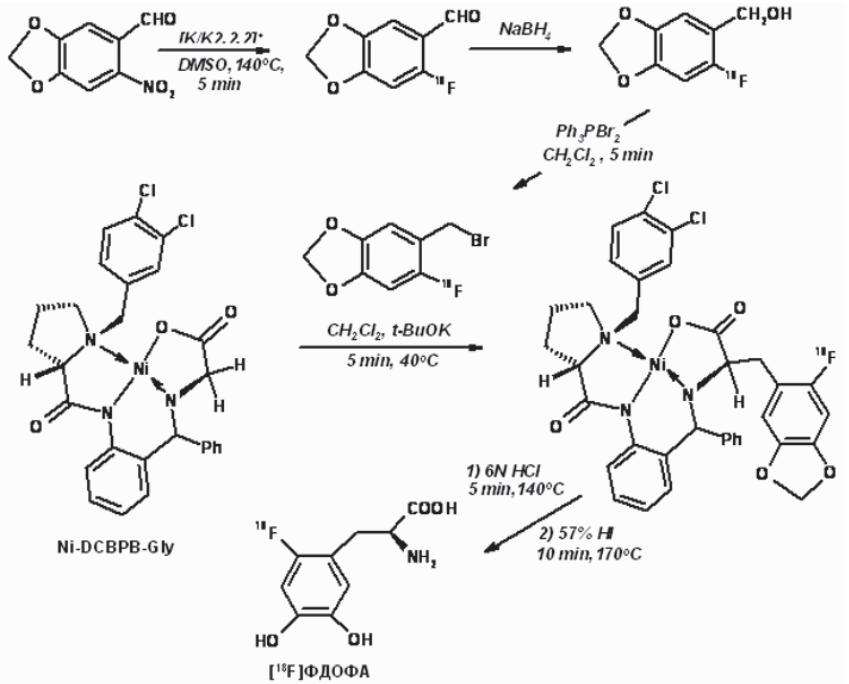


Рис. 3. Схема синтеза 6-[^{18}F]-L-ФДОФА методом стехиометрического асимметрического синтеза (Красикова и др., 2007)

et al., 1994). Общая схема синтеза 6-[^{18}F]-L-ФДОФА и 2-[^{18}F]-L-ФТИР приведена на рис. 4, в левой части рисунка представлена химическая структура межфазного хирального катализатора (МФХК) (Lemaire et al., 1994; 2004; Krasikova et al., 2004; Libert et al., 2013).

Как видно из схем, представленных на рис. 3 и 4, оба метода асимметрического синтеза включают несколько стадий, начиная с очень трудоемкого и длительного процесса получения меченого фтором-18 бензилгалогенида с несколькими промежуточными очистками (см. рис. 3, верхняя часть) (Lemaire et al., 1994). Для выполнения синтеза нужен сложный многофункциональный модуль и опытный радиохимик.

С целью упрощения процесса синтеза в 2009 г. группой немецких ученых был апробирован принципиально новый поход к получению 6-[^{18}F]-L-ФДОФА, включающий три основных стадии (Wagner et al., 2009) (рис. 5). Метод основан на реакции изотопного обмена стабильного фтора-19 (который является в данном случае «уходящей» группой) на радиоактивный фтор-18 в молекуле субстрата, где положение нуклеофильной атаки активировано карбонильной группой, а амино- и карбокси-функции аминокислоты защищены стерически объемным заместителем, с тем чтобы обеспечить сохранение структуры L-изомера в условиях радиофторирования. После окисления Байера–Виллигера (Bayer–Villiger) и кислотного гидролиза 6-[^{18}F]-L-ФДОФА выделяют из реакционной смеси методом полупрепаративной ВЭЖХ. Метод является исключительно перспективным и обеспечивает получение

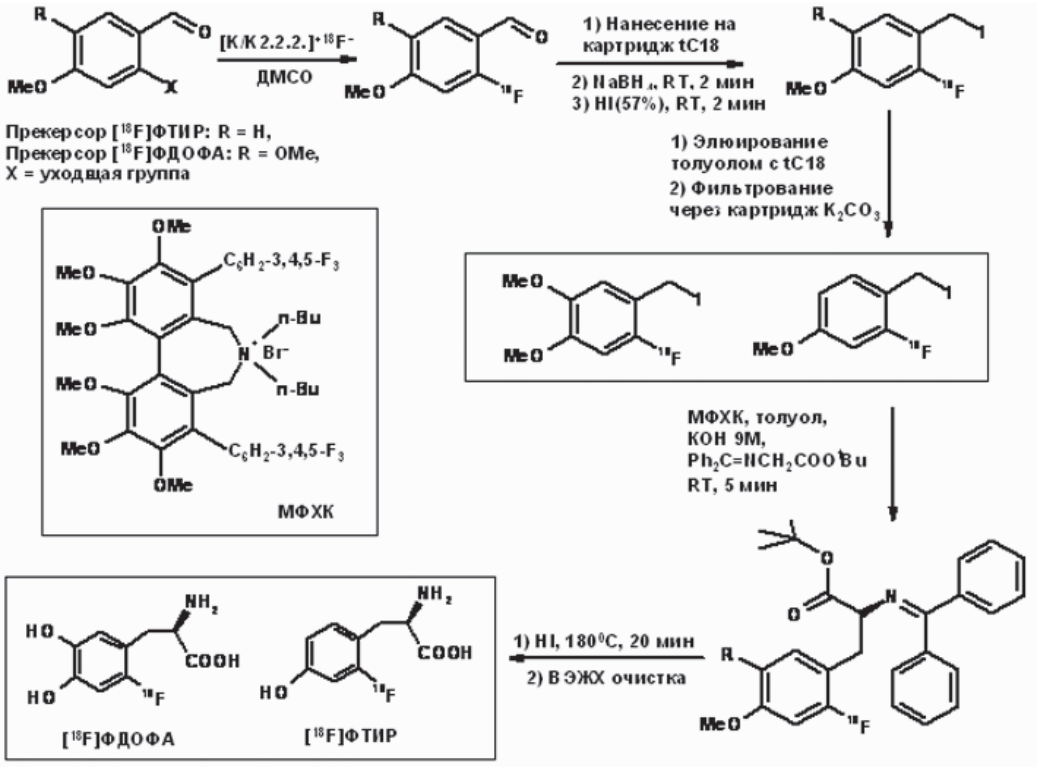


Рис. 4. Общая схема синтеза 6-[^{18}F]-L-ФДОФА и 2-[^{18}F]-L-ФТИР (Libert et al., 2013)

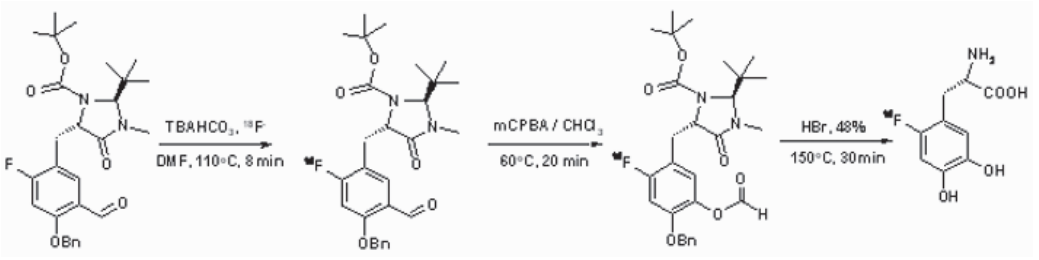


Рис. 5. Схема синтеза 6-[^{18}F]-L-ФДОФА (Wagner et al., 2009)

6-[^{18}F]-L-ФДОФА с энантиомерной чистотой более 95%. Тем не менее, в существующем варианте процесс синтеза является достаточно длительным и нуждается в улучшении радиохимического выхода. Кроме того, из-за использования в качестве уходящей группы фтора-19 6-[^{18}F]-L-ФДОФА получается в форме «с добавлением носителя», хотя удельная мольная активность существенно выше, чем при электрофильном синтезе данного РФП. Разработка метода получения предшественника с отличной от фтора-19 «уходящей» группой (например нитрогруппой) пока не увенчалась успехом.

5. Заключение

В целом, несмотря на несомненные успехи в разработке нуклеофильных методов синтеза [^{18}F]ФАА, в том числе и 6-[^{18}F]-L-ФДОФА, достигнутые в последние годы (Ermert, Coenen, 2013), до настоящего времени не удалось создать простой и удобный для автоматизации метод введения метки в ароматическое кольцо аминокислоты. Несмотря на низкую производительность и сложность работы с электрофильным газообразным фтором-18, именно электрофильный метод пока применяется в большинстве ПЭТ-центров для клинических исследований с данным РФП. Однако стоимость единичной клинической дозы «электрофильной» 6-[^{18}F]-L-ФДОФА очень высока. В России электрофильные методы синтеза РФП для ПЭТ до настоящего времени не используются; получение 6-[^{18}F]-L-ФДОФА путем многостадийного нуклеофильного синтеза по оригинальной технологии, разработанной в ИМЧ РАН (Красикова и др., 2007; Krasikova et al., 2004), было бы возможным при наличии современного многофункционального модуля синтеза для нуклеофильного радиофторирования.

Литература

Кодина Г.Е., Красикова Р.Н. Методы получения радиофармацевтических препаратов и радионуклидных генераторов для ядерной медицины. Учебное пособие для вузов. М.: МЭИ, 2014. 281 с.

Корсаков М.В. Основы ПЭТ радиохимии. СПб., 2002. 180 с.

Красикова Р.Н., Кузнецова О.Ф., Федорова О.С., Мосевич И.К., Малеев В.И., Белоконь Ю.Н., Савельева Т.Ф., Сагиян А.С., Дадаян С.А., Петросян А.А. Асимметрический синтез 6-^{18}F-L-FDOPA с использованием хиральных комплексов никеля (II) // Радиохимия. 2007. № 49. С. 449-454.

Adam M.J., Ruth T.J., Grierson J.R., Abeysekera B., Pate B.D. Routine synthesis of L-[^{18}F]6-fluorodopa with fluorine-18 acetylhypofluorite // J. Nucl. Med. 1986. Vol. 7. P. 1462-1468.

Barrio J.R., Huang S-C., Phelps M.E. Biological imaging and the molecular basis of dopaminergic diseases. Biochem Pharmacol. 1997. Vol. 54. P. 341-348.

Blessing G., Coenen H.H., Franken K., Qaim S.M. Production of [^{18}F]F_2, H^{18}F and ^{18}Faq − using the ^{20}Ne(d, α)^{18}F process // Appl. Radia. Isot. 1986. Vol. 37. P. 1135-1139.

Cai L., Lu S., Pike V.W. Chemistry with [^{18}F]fluoride ion // Eur. J. Org. Chem. 2008. P. 2853-73.

Coenen H.H., Elsinga P.H., Iwata R., Kilbourn M.R., Pillai M.R.A., Rajan M.G.R., Wagner H.N., Zaknun J.J. Fluorine-18 radiopharmaceuticals beyond [^{18}F]FDG for use in oncology and neurosciences // Nucl. Med. Biol. 2010. Vol. 37. P. 727-740.

Cumming P., Gjedde A. Compartmental analysis of dopa decarboxylation in living brain from dynamic positron emission tomograms // Synapse. 1998. Vol. 29. P. 37-61.

Dagher A., Owen A.M., Boecker H., Brooks D.J. The role of the striatum andhippocampus in planning: a PET activation study in Parkinson's disease // Brain. 2001. Vol. 124. P. 1020-1032.

De Vries E.F.J., Luurstema G., Brussermann M., Elsinga P.H., Vaalburg W. Fully automated synthesis module for the high yield one-pot preparation of 6-[^{18}F]fluoro-L-DOPA // Appl. Radiat. Isot. 1999. Vol. 51. P. 389-394.

Elsinga P.H., Hatano K., Ishiwata K. PET tracers for imaging of the dopaminergic system // Curr. Med. Chem. 2006. Vol. 13. P. 2139-2153.

Ermert J., Coenen H.H. Methods for ^{11}C- and ^{18}F-labelling of amino acids and derivatives for positron emission tomography imaging // J. Label. Comp. Radiopharm. 2013. Vol. 56. P. 225-236.

*Farde L.*Quantitative analysis of D2 dopamine receptor binding in the living human brain with PET // Science. 1986. Vol. 231. P. 258-261.

Farde L., Halldin C., Stone-Elander S., Sedvall G. PET analysis of human dopamine receptor subtypes using ^{11}C-SCH 23390 and ^{11}C-raclopride // Psychopharmacology. 1987. Vol. 92. P. 278-284.

Forsback S., Eskola O., Haaparanta M., Bergman J., Solin O. Electrophilic synthesis of 6-[^{18}F]fluoro-L-DOPA using post-target produced [^{18}F]F_2 // Radiochim. Acta. 2008. Vol. 96. P. 845-848.

Fuchtner F., Angelberger P., Kvaternik H., Hammerschmidt F., Simovc B.P., Steinbach J. Aspects of 6-[^{18}F] fluoro-L-DOPA preparation: precursor synthesis, preparative HPLC purification and determination of radiochemical purity // Nucl. Med. Biol. 2002. Vol. 29. P. 477-481.

Garnett E.S., Firnau G., Nahmias C. Dopamine visualized in the basal ganglia of living man // Nature. 1983. Vol. 305. P. 137-138.

Halldin C., Farde L., Hogberg T., Mohell N., Hall H., Suhara T. et al. Carbon-11-FLB 457: a radioligand for extrastriatal D_2 dopamine receptors // J. Nucl. Med. 1995. Vol. 36. P. 1275-1281.

Halldin C., Gulyas B., Langer O., Farde L. Brain radioligands-state of the art and new trends // Q. J. Nucl. Med. 2001. Vol. 45. P. 139-152.

Halldin C., Erixon-Lindroth N., Pauli S., Chou Y.H., Okubo Y., Karlsson P. et al. [(11)C]PE2I: a highly selective radioligand for PET examination of the dopamine transporter in monkey and human brain // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2003. Vol. 30. P. 1220-1230.

Huang W.S., Chiang Y.H., Lin J.C. et al. Crossover study of (99m)Tc-TRODAT-1 SPECT and (18)F-FDOPA PET in Parkinson's disease patients // J. Nucl. Med. 2003. Vol. 44. P. 999-1005.

Koopmans K.P., Brouwers A.H., De Hooge M.N., Van der Horst-Schrivers A.N., Kema I.P., Wolffenbuttel B.H., De Vries E.G., Jager P.L. Carcinoid crisis after injection of 6-^{18}F-fluorodihydroxyphenylalanine in a patient with metastatic carcinoid // J. Nucl. Med. 2005. Vol. 46. P. 1240-1243.

Krasikova R.N., Zaitsev V.V., Ametamey S.M., Kuznetsova O.F., Fedorova O.S., Mosevich I.K., Belokon Y.N., Vyskočild Š., Shatik S.V., Nader M., Schubiger P.A. Catalytic enantioselective synthesis of ^{18}F-fluorinated α-amino acids under phase transfer conditions using (*S*)-NOBIN // Nucl. Med. Biol. 2004. Vol. 31. P. 597-603.

Lammertsma A.A., Hume S.P. Simplified reference tissue model for PET receptor studies // Neuroimage. 1996. Vol. 4. P. 153-158.

Laruelle M. Imaging synaptic neurotransmission with in vivo binding competition techniques: a critical review // J. Cereb. Blood. Flow. Metab. 2000. Vol. 20. P. 423-429.

Lee C.M., Farde L. Using positron emission tomography to facilitate CNS drug development // Trends Pharmacol. Sci. 2006. Vol. 27. № 6. P. 310-316.

Lemaire C., Damhaut P., Plenevaux A., Comar D. Enantioselective synthesis of 6-[fluorine-18]-fluoro-L-dopa from no-carrier-added fluorine-18-fluoride // J. Nucl. Med. 1994. Vol. 35. P. 1996-2002.

Lemaire C., Gillet S., Guillouet S., Plenevaux A., Aerts J., Luxen. Highly enantioselective synthesis of no-carrier-added 6-[^{18}F]Fluoro-L-dopa by chiral phase-transfer alkylation // Eur. J. Org. Chem. 2004. Vol. 13. P. 2899-2904.

Libert L.C., Franci X., Plenevaux A.R., Ooi T., Maruoka K., Luxen A.J., Lemaire C.F. Production at the curie level of no-carrier-added 6-^{18}F-Fluoro-L-Dopa // J. Nucl. Med. 2013. Vol. 54. P. 1-8.

Mason N.S., Mathis C.A., Klunk W.E. Positron emission tomography radioligands for in vivo imaging of A_β plaques // J. Label. Compds. Radiopharm. 2013. Vol. 56. P. 89-95.

McCarthy T.J. Positron emission tomography imaging as a key enabling technology in drug development // Ernst. Schering. Res. Found Workshop. 2007. Vol. 62. P. 329-39.

Minn H., Kauhanen S., Seppanen M., Nuutila P. ^{18}F-FDOPA: A multiple-target molecule // J. Nucl. Med. 2009. Vol. 50. P. 1915-1918.

Någren K., Halldin C., Rinne J.O. Radiopharmaceuticals for positron emission tomography investigations of Alzheimer's disease // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2010. Vol. 37. P. 1575-1593.

Phelps M.E., Maziotta J.C., Schelbert H.R. – eds. Positron emission tomography and autoradiography. Principles and application for the brain and heart. NY, 1986.

Rowe C.C., Villemagne V.L. Brain amyloid imaging // J. Nucl. Med. 2011. Vol. 52. P. 1-8.

Schou M., Steiger C., Varrone A., Guilloteau D., Halldin C. Synthesis, radiolabeling and preliminary in vivo evaluation of [^{18}F]FE-PE2I, a new probe for the dopamine transporter // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2009. Vol. 19. P. 4843-4845.

Seibyl J.P., Chen W., Silverman D. H.S. 3,4-Dihydroxy-6-[^{18}F]-Fluoro-L-phenylalanine positron emission tomography in patients with central motor disorders and in evaluation of brain and other tumors // Sem. Nucl. Med. 2007. Vol. 37. P. 440-450.

Vandenberghe K., Van Laere, A. Ivanoiu A. et al. ^{18}F-flutemetamol amyloid imaging in Alzheimer disease and mild cognitive impairment: a phase 2 trial // Ann. Neurol. 2010. Vol. 68. P. 319-329.

Volkow N.D., Fowler J.S., Wang G.J., Swanson J.M., Telang F. Dopamine in drug abuse and addiction: results of imaging studies and treatment implications // Arch. Neurol. 2007. Vol. 64. P. 1575-1579.

Wagner F.M., Ermert J., Coenen H.H. Three-Step, «One-Pot» radiosynthesis of 6-fluoro-3,4-dihydroxy-L-phenylalanine by isotopic exchange. // J. Nucl. Med. 2009. Vol. 50. P. 1724-1729.

Wahl R.L., Buchanan J.W. Principles and practice of positron emission tomography. Philadelphia, Lippincott: Williams & Wilkins, 2002. 462 p.

Использование магнитно-резонансной спектроскопии для диагностики и мониторинга лечения неврологических и психических заболеваний

Н.А. Семенова, Т.А. Ахадов, М.В. Ублинский, С.Д. Варфоломеев

Содержание

1. Введение
2. Явление ЯМР и магнитно-резонансная спектроскопия
3. ^{1}H МР спектры мозга: отнесение сигналов, функция и метаболизм ^{1}H МР-видимых соединений
4. Метаболические сдвиги в коре больших полушарий при тяжелой черепно-мозговой травме (острый и подострый периоды)
5. Динамика церебральных метаболитов в условиях нагрузки
6. Сигнал лактата и предикторы неблагоприятного исхода комы

1. Введение

Магнитно-резонансная спектроскопия (МРС) является одним из крайне немногочисленных методов прижизненного исследования химических процессов, протекающих в органах и тканях человека. Метод позволяет *in vivo* определять концентрации ряда важнейших метаболитов, присутствующих в цитозоле клеток, оценивать кислотность внутриклеточной среды (pH_{int}), исследовать компартментализацию, измерять скорость некоторых химических реакций. Без таких данных невозможны современные представления о метаболизме, необходимые для развития молекулярной медицины. Настоящая работа является обзором собственных исследований метаболизма мозга человека в норме и патологии. Обзор предваряется общими сведениями о явлении ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и информацией о МР-спектрах. Подробное изложение принципов ЯМР-спектроскопии можно найти в (Лундин, Федин, 1986; Сергеев, 1981; Gunter, 1995).

2. Явление ЯМР и магнитно-резонансная спектроскопия

Явление магнитного резонанса состоит в поглощении электромагнитного излучения в радиочастотном диапазоне ядрами, находящимися в постоянном магнитном поле. Этой способностью обладают ядра, имеющие собственный магнитный момент, или спин. К таким ядрам относятся ^{1}H, ^{31}P, ^{13}C, входящие в состав молекул биологических систем.

Сокращения: ГАМК – γ-аминомасляная кислота; ГО – гемодинамический ответ; МРС – магнитно-резонансная спектроскопия; фМРТ – функциональная магнитно-резонансная томография; ФФК – фосфофруктокиназа; ЧМТ – черепно-мозговая травма; ЯМР – ядерно-магнитный резонанс; AcCoA – ацетилкоэнзим А; ASPA – аспартоацилаза; dHb – дезоксигемоглобин; Hb – оксигемоглобин; NAA – N-ацетиласпартат; PCho – фосфохолин.

Магнитное ядро, помещенное в постоянное магнитное поле, приобретает дискретный набор разрешенных энергетических состояний. Для ядер со спином 1/2 (например ^{1}H) таких состояний два. Разность энергий между этими энергетическими состояниями пропорциональна напряженности постоянного магнитного поля B_0:

$\Delta E = \gamma \hbar B_0$,

где $\hbar$ – постоянная Планка, ΔE – разность энергий между магнитными уровнями, γ – гиромагнитное отношение (определяется строением ядра); $\hbar \cdot 2\pi\nu = \Delta E$, где ν – частота переходов между энергетическими уровнями, или резонансная частота. Отсюда:

$$\nu = \gamma B_0 / 2\pi \ . \qquad (1)$$

В магнитном поле с напряженностью B_0 частоты, при которых происходит переход, имеют строго фиксированное значение, поэтому их называют частотами ядерного магнитного резонанса. ЯМР-частоты ядер лежат в пределах радиодиапазона. Из-за низких энергий радиочастотное излучение считается биологически безопасным.

В постоянном магнитном поле B_0 в тепловом равновесии большая часть ядер находится в нижнем из разрешенных энергетических состояний, создавая макроскопическую намагниченность образца, ориентированную по полю. Если ядра облучать частотой, равной резонансной, они поглотят энергию излучения и перейдут в верхнее энергетическое состояние, а вектор макроскопической намагниченности «отклонится» от своего первоначального положения. По прекращении внешнего воздействия ядра возвращаются на нижний энергетический уровень, испуская энергию на частоте резонанса. Это излучение вызывает э.д.с. в приемной катушке и детектируется как сигнал спада свободной индукции. Возвращение ядер в нижнее состояние, а вектора намагниченности в свое первоначальное положение называется релаксацией. Восстановление продольной составляющей вектора намагниченности называется спин-решеточной релаксацией и характеризуется временем спин-решеточной релаксации T1. Процесс релаксации в поперечном направлении называется спин-спиновой релаксацией и характеризуется временем T2.

Ядро в составе молекулы испытывает действие локального магнитного поля, возникающего вследствие взаимодействия электронов химической связи с внешним магнитным полем. В результате происходит сдвиг частоты, зависящий от электронного окружения ядра. Этот сдвиг, называемый химическим сдвигом δ, является причиной возникновения ЯМР-спектра. В спектре частотные сдвиги резонансов ядер определяются химическим строением молекулы и являются специфической характеристикой для каждого из ее структурных фрагментов. Величины δ малы по сравнению с резонансной частотой ядра и измеряются в миллионных долях. Значения δ отсчитываются от выбранного реперного сигнала. В ^{1}H МР-спектрах это сигнал протонов воды (δ=4,7 ppm), в ^{31}P МР-спектрах – сигнал фосфатной группы фосфокреатина (δ=0 ppm). В молекулах ядерные магнитные моменты взаимодействуют друг с другом. Взаимодействие ядерных спинов между атомами соседних групп разной химической структуры через электроны химических связей или между химически неэквивалентными атомами в составе одной группы приводит к расщеплению соответствующих сигналов на мультиплеты. Этот эффект, имеющий на-

звание «спин-спиновое взаимодействие», подчиняется строгим закономерностям, определяющим число линий в мультиплете и величину константы спин-спинового взаимодействия (Лундин, Федин, 1986; Сергеев, 1981; Gunter, 1995).

При исследовании метаболизма методом ЯМР величины δ, интенсивности сигналов, константы спин-спинового взаимодействия, мультиплетность сигнала позволяют установить химическую структуру отдельных метаболитов в тканевых экстрактах, а затем изучать их относительное содержание *in vivo*. Концентрации метаболитов *in vivo* определяют по интенсивности идентифицированных сигналов их молекулярных фрагментов, нормированной на интенсивность сигнала внутреннего концентрационного стандарта – соединения, концентрация которого известна и не изменяется в изучаемом процессе (Diehl et al., 1992). Помимо идентификации эффекты спин-спинового взаимодействия используют в целях спектрального редактирования, поскольку они позволяют разделить сигналы с перекрывающимися химическими сдвигами (Williams et al., 1988). Релаксационные характеристики сигналов необходимо учитывать в импульсных последовательностях, использующихся как для локализации области интереса – объема ткани (вокселя), в котором исследуют метаболизм, так и для спектрального редактирования. К сожалению, воксель часто не может быть уменьшен до желаемых размеров из-за низкой чувствительности метода. Именно чувствительность является основным ограничением МРС. Даже используя поле с напряженностью 3Т, удовлетворительное соотношение сигнал/шум в ^{1}H МР-спектрах (протоны имеют максимальную магнитную восприимчивость) за разумное время можно получить в объеме не менее 8 см^3 и детектировать сигналы соединений, концентрации которых выше 1 мМ. В таких количествах в клетках присутствуют предшественники и конечные продукты метаболических путей.

МРС на протонах и гетероядрах позволяет исследовать разнообразные метаболические потоки. С помощью ^{1}H МРС изучают метаболизм аминокислот, анаэробный метаболизм глюкозы, методом ^{31}P МРС – энергетический обмен, методом ^{13}C МРС – метаболизм глюкозы и лекарственных препаратов. На ядрах ^{23}Na , ^{39}K исследуют ионный транспорт, на ядрах ^{19}F – метаболизм и фармакокинетику фторсодержащих лекарственных препаратов. В медицине по причинам, связанным с необходимостью быстро получить спектр с удовлетворительным отношением сигнал/шум, используют ^{1}H МРС и в значительно меньшей степени ^{31}P МРС, поскольку чувствительность ^{31}P МР составляет лишь 7% от чувствительности ^{1}H МР.

3. ^{1}H МР-спектры мозга: отнесение сигналов, функция и метаболизм ^{1}H МР-видимых соединений

В ^{1}H МР-спектрах мозга в норме (рис 1) детектируются сигналы N-ацетильной группы N-ацетиласпартата (NAA, δ=2,0 ppm), протонов группы $-N+(CH_3)_3$ холинсодержащих соединений (Cho, δ=3,2 ppm), фосфокреатина + креатина (Cr, δ=3,0 ppm), $-CH_2$-групп глутамата и глутамина (Glx, δ=2,2 и 3,7 ppm), сигнал 1,3, 4,6 – протонов шестичленного кольца инозитола (mI, δ=3,56 ppm) (Diehl et al., 1992).

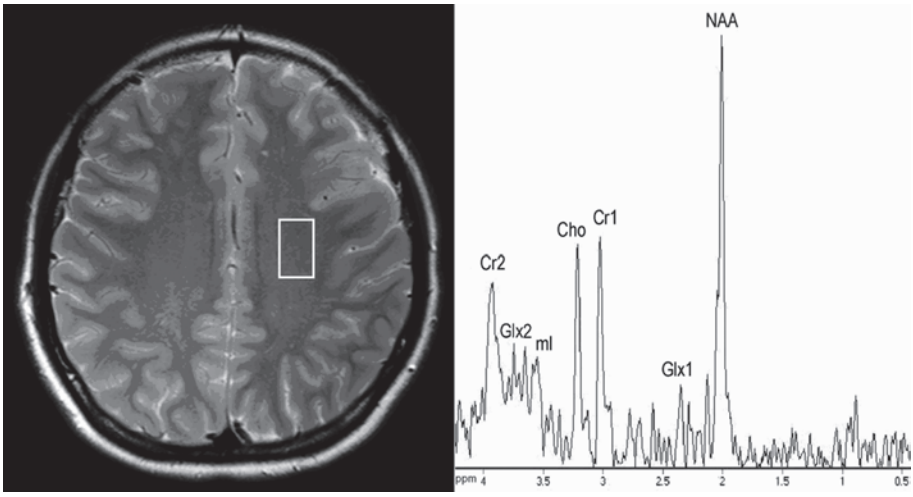


Рис. 1. Спектр белого вещества головного мозга (теменная доля), норма
NAA – N-ацетиласпартат, Glx – глутамат и глутамин, Cr – креатин+фосфокреатин, Cho – холинсодержащие соединения, mI – миоинозитол

В условиях гипоксии и ишемии в спектрах появляются сигналы метильной группы лактата (Lac, δ=1,34 ppm). Сигнал метильных и метиленовых протонов (Lip, δ=0,9 и 1,3), возникающий при некоторых патологических состояниях, обычно относят к жирнокислотным фрагментам липидов (Diehl et al., 1992).

Два сигнала – NAA и mI, используются как клеточные маркеры. NAA – нейрональный маркер, локализуется в нейронах; интенсивность этого сигнала пропорциональна уровню функционально полноценных нейронов в исследуемом объеме (Baslow, Guilfoyle, 2006). Сигнал mI – маркер астроцитов; рост интенсивности этого сигнала указывает на активацию глии или активацию пролиферации астроцитов (Ross et al., 1997). Остальные сигналы относятся к соединениям, распространенным во всех типах клеток нервной ткани. Их используют как метаболические маркеры (Ross, Bluml, 2001). Сигналы Cr и Cho является показателями энергетического и липидного обмена, соответственно. Интенсивность сигнала GLx характеризует уровень возбуждающего нейромедиатора глутамата.

Метаболизм NAA хорошо изучен. Это соединение синтезируется в митохондриях нейронов из аспартата и ацетил-коэнзима А под действием L-аспартат-N-ацетилтрансферазы и в незначительных количествах образуется как продукт катаболизма нейротрансмиттера N-ацетиласпартилглутамата. Разлагается NAA путем гидролиза в олигодендроцитах (рис. 2) (Baslow, Guilfoyle, 2006).

Известно лишь одно заболевание – болезнь Канавана, при котором регистрируется превышающий норму уровень NAA (Baslow, Guilfoyle, 2006). Оно обусловлено отсутствием фермента гидролиза NAA, аспартоацилазы. При других заболеваниях уровень NAA либо снижается, либо не отличается от нормы. Это дает основания для заключения, что снижение NAA происходит вследствие нарушений процессов синтеза этого соединения и отражает снижение активности митохондрий нейронов.

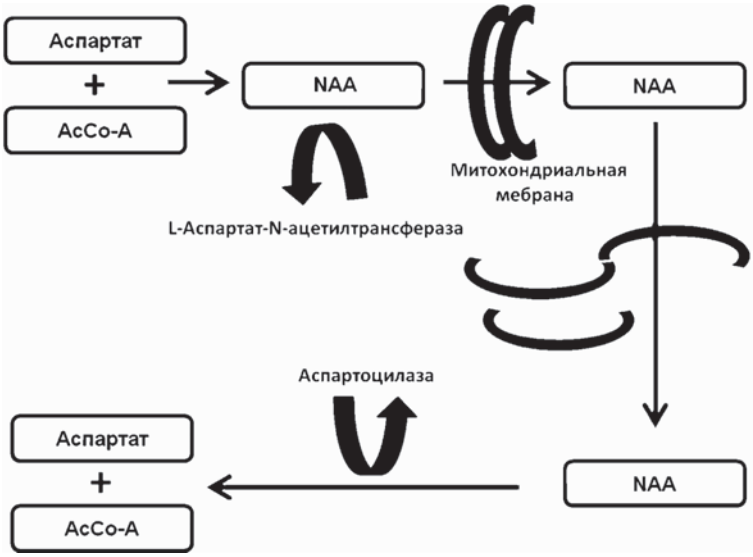


Рис. 2. Схема метаболизма NAA

Креатин не только транспортируется в мозг из печени, почек и поджелудочной железы, но и синтезируется в клетках мозга. Это соединение образуется в две стадии с участием аргинин-глицин-амадинотрансферазы и гуанидиноацетатметилтрансферазы. Показано, что в нейронах и глиальных клетках в большом количестве экспрессируются гены обоих ферментов (Brassiant et al., 2007). Считают (Brassiant et al., 2007), что основное количество церебрального креатина эндогенного происхождения. Фосфокреатин, продукт фосфорилирования креатина, является запасным источником макроэргов и используется для синтеза АТФ, при этом он превращается в креатин. Поэтому в условиях острой ишемии суммарное содержание креатина и фосфокреатина постоянно (Demougeot et al., 2004).

Сигнал Cho представляет собой суперпозицию резонансов холина, фосфохолина (PCho) и глицерофосфохолина. Основной вклад в сигнал вносит PCho, который в мозге, в частности – нейронах, синтезируется в трех последовательных реакциях переметилирования из фосфатидилэтаноламина (Magret et al., 1996). Холинсодержащие соединения являются предшественниками синтеза и продуктами распада мембранных фосфолипидов (Ross, Bluml, 2001).

4. Метаболические сдвиги в коре больших полушарий при тяжелой черепно-мозговой травме (острый и подострый периоды)

Сведения о метаболизме и функциях соединений, сигналы которых регистрируются в спектрах мозга, позволяют объяснить сдвиги метаболизма, которые мы наблюдали в неповрежденной, по данным диагностической МРТ, лобно-теменной коре детей в остром и подостром периоде после тяжелой черепно-мозговой травмы

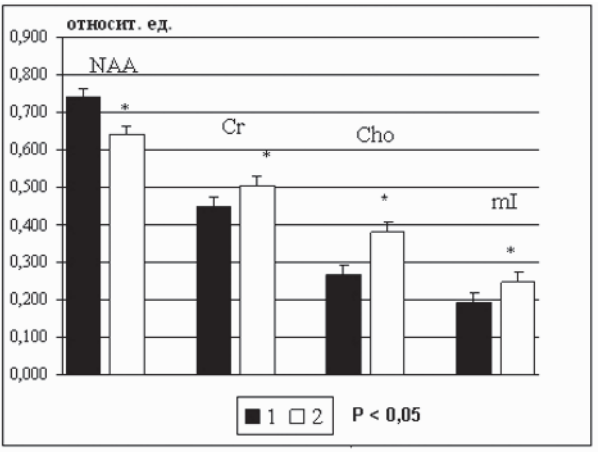


Рис. 3. Средние значения (± стандартное отклонение) относительных интенсивностей сигналов метаболитов в спектрах неповрежденной лобно-теменной коры головного мозга пациентов в группе нормы (1) и в группе тяжелой ЧМТ (2)

(ЧМТ) (Семенова и др., 2011, 2012). Мы обнаружили снижение NAA, рост Cho, Cr и mI (рис. 3).

Кроме того, мы выявили достоверные корреляции концентраций метаболитов в парах NAA–Cr, NAA–Cho, Cr–Cho как в норме, так и при травме (табл.)

Корреляций между глиальным маркером mI и метаболическими маркерами Cr, Cho не найдено. Это позволило нам отнести вызванный травмой рост уровней Cr и Cho к процессам, происходящим в нейронах, а увеличение mI – к активации астроцитов.

Представив метаболический процесс как последовательность ферментативных реакций, каждая из которых катализируется собственным ферментом, и воспользовавшись стандартными кинетическими уравнениями, мы получили зависимости концентраций NAA–Cr, NAA–Cho, Cr–Cho и предложили схему метаболизма в нейронах (рис. 4) (Семенова и др., 2012).

Согласно схеме, после ЧМТ в нейронах неповрежденной, по данным МРТ, коры больших полушарий вследствие активации компенсаторных процессов, связанных с синтезом креатина и холина, обедняется субстратами цикл Кребса, что приводит к угнетению синтеза NAA. Следовательно, для ускорения процессов компенсации могут быть полезны субстраты цикла Кребса.

Таблица

Статистически достоверные (p<0,005) коэффициенты линейных корреляций (R) между метаболитами в лобно-теменной коре мозга человека в норме и в неповрежденной лобно-теменной коре при ЧМТ

Состояние	R_{NAA-Cr}	$R_{NAA-Cho}$	R_{Cr-Cho}
норма	0,65	0,64	0,61
травма	0,82	0,53	0,66

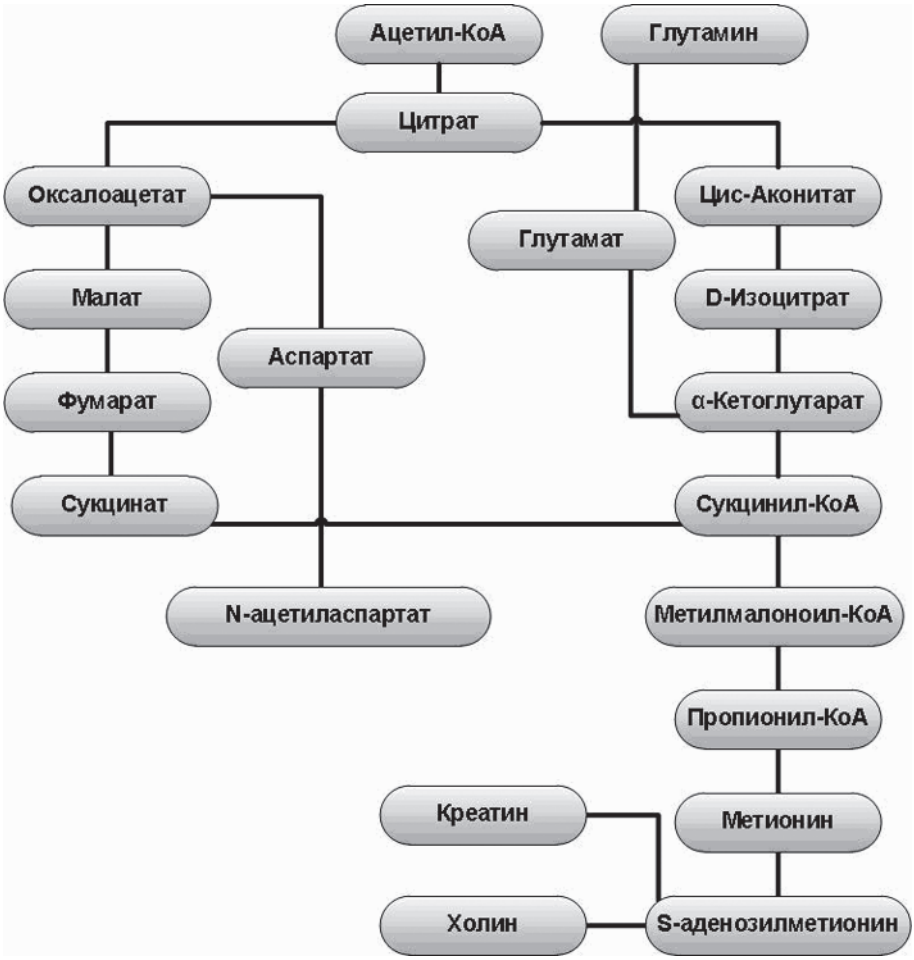


Рис. 4. Схема метаболической цепи в нейронах, связывающей Cr, Cho и NAA

Этот вывод косвенно подтверждает наше исследование уровня γ-аминомасляной кислоты (ГАМК) в неповрежденных лобных долях детей в остром периоде после ЧМТ. В мозге человека ГАМК присутствует в низкой для МРС концентрации (1 мМ).

В молекуле ГАМК присутствуют три метиленовых группы (рис. 5б), протоны которых связаны спин-спиновым взаимодействием. Сигналы этих протонов перекрываются с сигналами метаболитов, присутствующих в мозге в более высоких, чем ГАМК, концентрациях: с NAA (σ=2 ppm), Cr (σ=3 ppm), Glx (σ=2, ppm) (рис. 5а). Получить сигнал ГАМК *in vivo* позволяет метод спектрального редактирования, основанный на эффекте спин-спинового взаимодействия (Rothman et al., 1993). Метиленовая группа ГАМК с сигналом при σ=3 ppm взаимодействует с протонами -CH2-группы при 1,9 ppm, тогда как протоны Cr с σ=3 ppm не имеют спин-спинового взаимодействия. Эта разница и создает возможность отделить сигнал ГАМК от сигнала Cr. Включение в стандартную импульсную последовательность (PRESS, или STEM) селективного импульса на частоте 1,9 ppm окажет прямое воздействие

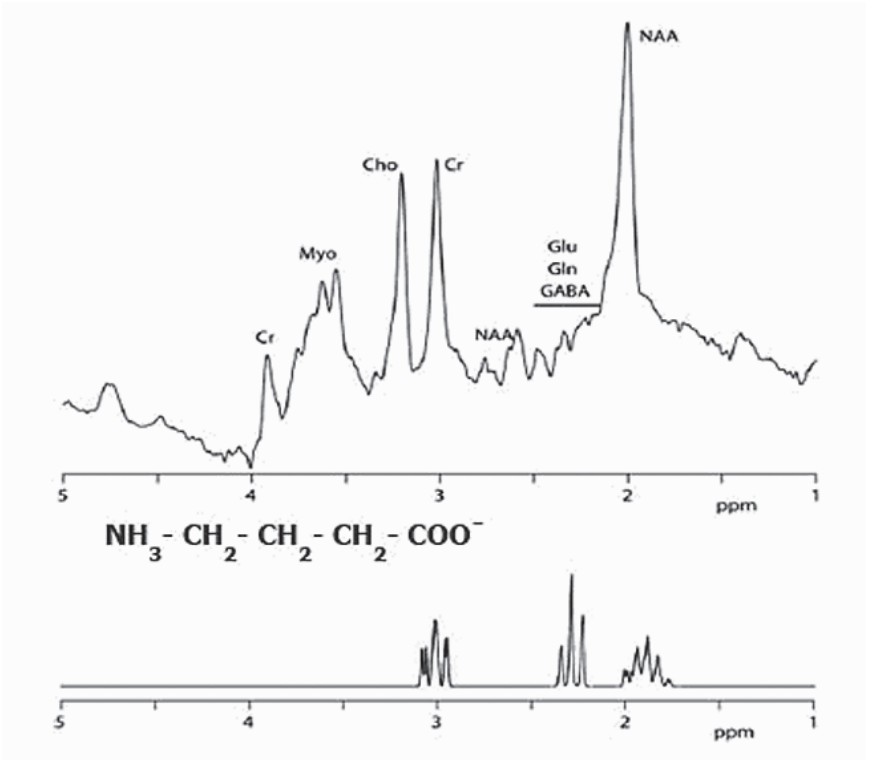


Рис. 5. Наверху – 1H МР-спектр мозга человека; внизу – 1H МР-спектр водного раствора ГАМК (напряженность постоянного магнитного поля 3Т) (Puts, Edden, 2012)

на резонансы около 1,9 ppm и косвенное, через спин-спиновое взаимодействие, на резонанс ГАМК при σ=3 ppm. При этом резонанс структурного фрагмента Cr при 3 ppm окажется не затронутым, поскольку у него спин-спинового взаимодействия нет. Вычитание данных, полученных с применением селективного импульса и без него, дает спектр, представленный на рис. 6. В нем содержатся только сигналы ГАМК и Glx.

Используя этот метод спектрального редактирования, мы показали, что в неповрежденных, по данным диагностической МРТ, лобных долях пациентов в остром периоде после ЧМТ наблюдается корреляция между содержанием ГАМК и Glx (рис. 7).

Наличие этой корреляционной связи может быть следствием активации метаболического пути, называемого ГАМК – шунтом (рис. 8).

Этот путь активируется при нарушениях энергетического обмена и позволяет пополнять дефицит субстратов цикла Кребса. ГАМК-шунт реализуется исключительно в ГАМК-ергических нейронах (Siegel et al., 1999). Только в них найден фермент глутаматдекарбоксилаза, катализирующий образование ГАМК из глутамата (см. рис. 8). Таким образом, наши данные по исследованию ГАМК позволяют предположить, что метаболическим последствием травмы является обеднение цикла Кребса субстратами и, по крайней мере в ГАМК-ергических нейронах, потерю субстратов компенсирует активация ГАМК-шунта. Следовательно, этот результат,

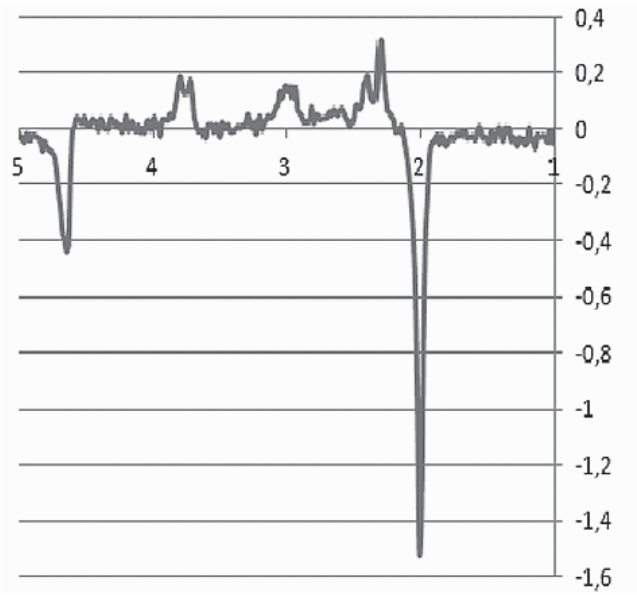


Рис. 6. Редактированный 1Н МР-спектр лобной доли мозга волонтера

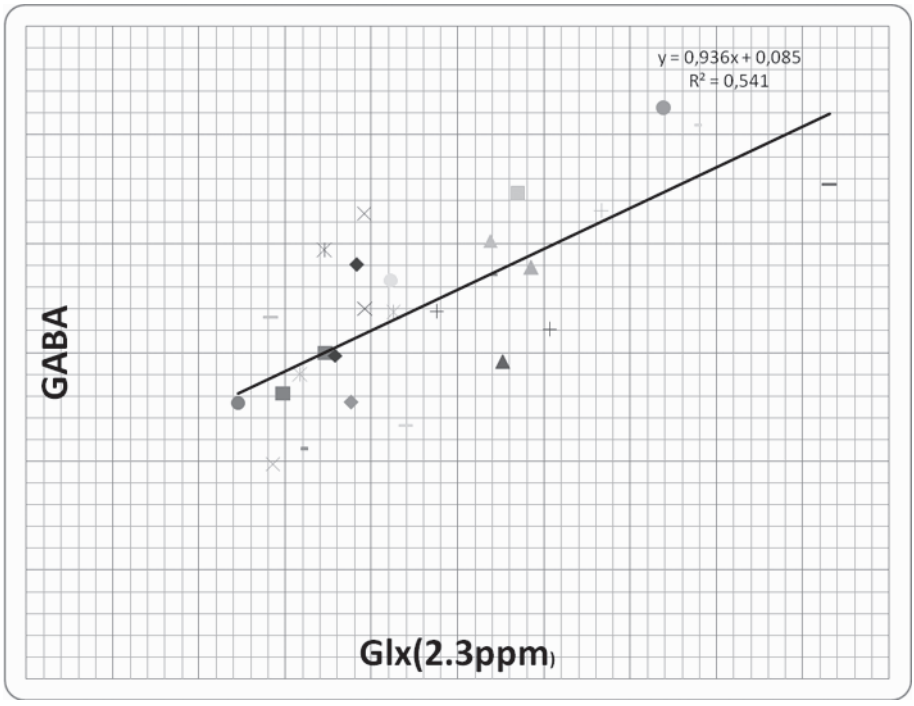


Рис. 7. Корреляции интенсивностей сигналов ГАМК и Glx в неповрежденных лобных долях детей с ЧМТ (острый период)

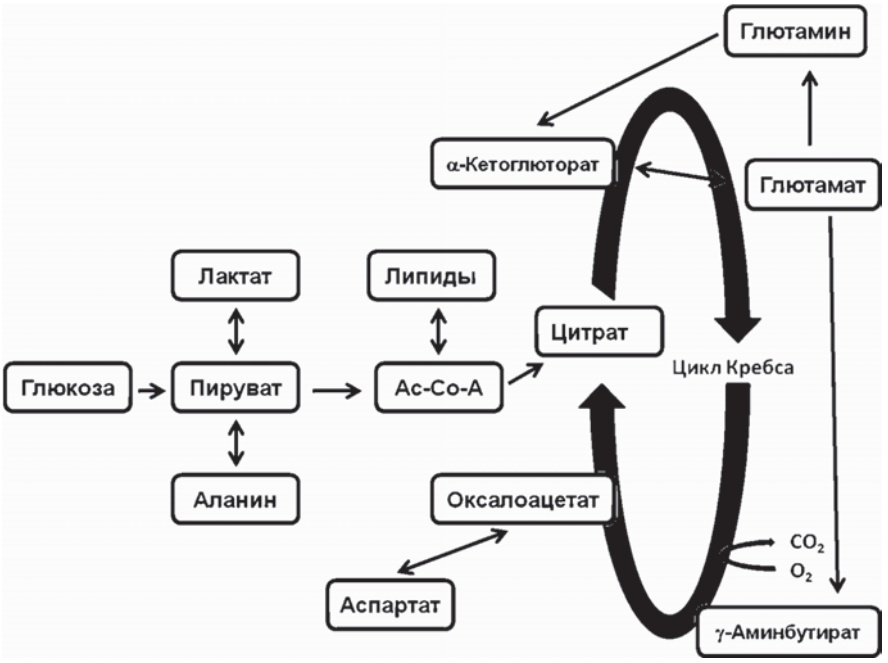


Рис. 8. Схема метаболической цепи «ГАМК-шунт»

как и результат нашего исследования нарушений метаболизма в не поврежденной травмой парацентральной коре, позволяет предполагать терапевтический эффект от введения субстратов цикла Кребса при ЧМТ.

5. Динамика церебральных метаболитов в условиях нагрузки

Поскольку интенсивность сигнала NAA отражает активность митохондрий нейронов, важно выяснить, как изменяется уровень NAA в динамике нагрузки.

Выполнение какой-либо задачи вызывает в специфических локусах головного мозга активацию кровотока, лишь частично соответствующую увеличению потребления кислорода (Fox, Raichle, 1986). Это приводит к росту концентрации оксигемоглобина (Hb) относительно концентрации дезоксигемоглобина (dHb). Последний является МРТ-контрастом, снижающим T2* протонов тканевой воды. Таким образом, изменение (Hb)/(dHb) создает контраст, зависящий от степени насыщения крови кислородом (blood oxygenation level, BOLD – контраст) и опосредованно характеризующий активность нейронов.

BOLD-сигнал визуализируется в МРТ-изображениях как локальные изменения контрастности в течение 2–16 с после предъявления стимула.

Основанная на регистрации BOLD-сигнала функциональная магнитно-резонансная томография (фМРТ) широко используется для выявления зон активности в мозге в норме, получила она широкое применение и для исследования патогенеза различных психических расстройств, в том числе такого, как шизофрения.

В рамках фМРТ-исследований часто используют задачу на избирательное внимание – парадигму oddball, которая заключается в предъявлении двух видов стимулов с инструкцией реагировать только на один из них (такой тип стимулов называется целевыми) и игнорировать другой тип стимулов, называемых нецелевыми.

Предъявление чередующихся целевых и нецелевых стимулов позволяет выявить области мозга, активация которых соотносится по времени с предъявлением каждого вида стимулов. Появляется возможность определить локусы, активирующиеся при правильных ответах, отделить их от областей, связанных с ошибками, и установить связи между активацией мозга и работой. Исследуя больных в начальной стадии шизофрении и соответствующих им по возрасту и полу продромов и нормальных испытуемых (Ублинский и др., 2013), мы предъявили следующее задание: нажимать на кнопку большим пальцем правой руки, когда в наушниках появляется звук (целевой стимул), при отсутствии звука на кнопку не нажимать. На рис. 9 представлена аксиальная проекция типичных данных объемного гемодинамического ответа (ГО) на предъявление звуковых стимулов. Можно видеть, что наиболее выраженными зонами активации ГО являются зоны слуховой и моторной коры, область префронтальной коры активирована значительно слабее. Анализ BOLD-сигнала позволил выявить временную зависимость относительной концентрации dHb в условиях предъявления нагрузки в наиболее активированной зоне – премоторной коре.

График функции ГО в зоне, ответственной за активацию движений большого пальца правой руки, представлен на рис. 10.

Вид функции ГО для групп больных шизофренией, продромов и нормы одинаков: максимум наблюдается на 6-ой секунде, к 10 секундам значения возвращаются к исходным. Временной задержки ГО у больных по сравнению с нормой не

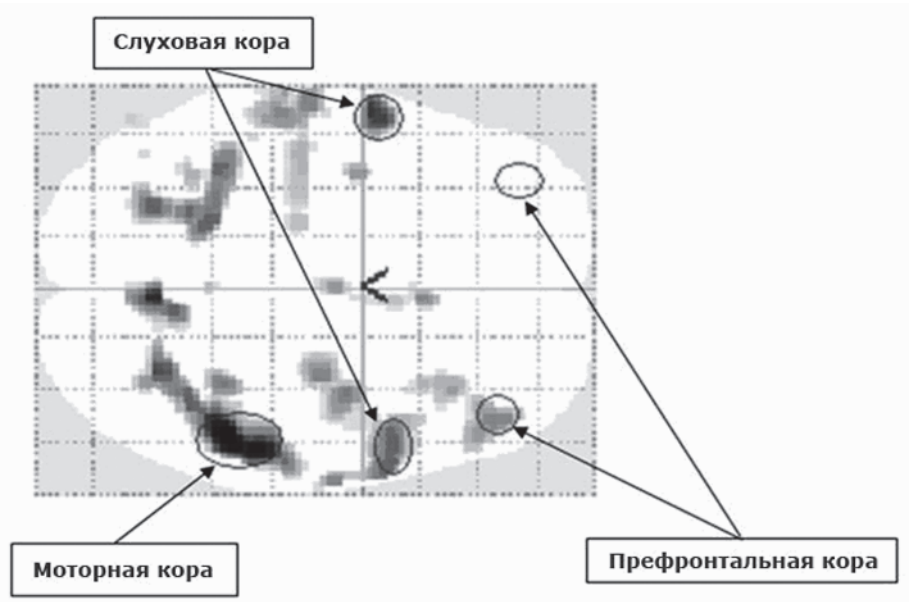


Рис. 9. Зоны ГО на карте головного мозга (аксиальная проекция) в пространстве Талайраха

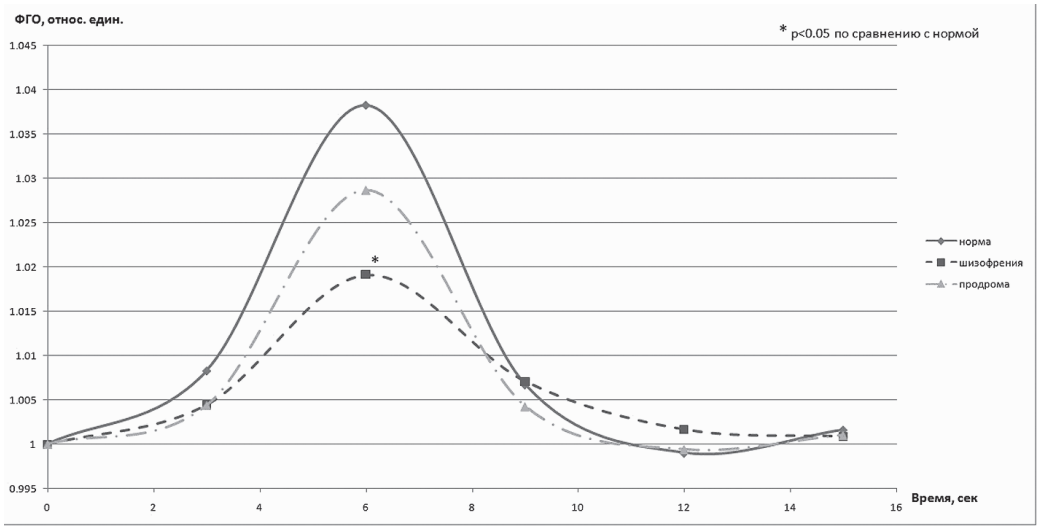


Рис. 10. График функции ГО для групп нормы и патологии в зоне премоторной коры
Точками обозначены усредненные по группе значения ГО (±стандартное отклонение). *p<0,05

наблюдается, но амплитуда BOLD-сигнала на 4–8-й секундах в группе больных шизофренией достоверно ниже, чем у нормы. Группа продромов лежит между нормой и группой шизофрении с максимумом ФГО, достоверно не отличающимся ни от нормы, ни от больных шизофренией. Можно ожидать, что увеличение размеров выборок позволит достоверно различить величину максимума ФГО для продромов, нормы и больных на ранней стадии шизофрении.

На основании исследования функции ГО на целевые стимулы можно заключить, что в зоне моторной коры у больных в состоянии ремиссии на ранней стадии шизофрении достоверно снижена амплитуда BOLD-сигнала при неизменных временных характеристиках и виде функции ГО.

Как правило, флуктуации BOLD-сигнала рассматривают как отражение изменения активности соответствующих нейрональных сетей, и с этой точки зрения результаты свидетельствуют о снижении данной активности вследствие, возможно, ее десинхронизации в моторной коре при шизофрении.

В основе функциональных нарушений лежат сдвиги в метаболизме. Поэтому полученные данные важно рассмотреть именно с точки зрения изменений обменных процессов при совершении мозгом работы. Характеристикой ответа на эту работу является функция ГО. Известно, что в норме ГО пропорционален уровню потребляемой мозгом глюкозы (Logothetis, Wandell, 2004). По данным (Zhang et al., 2011), скорость потребления глюкозы коррелирует с ГО на одиночные слуховые стимулы в парадигме oddball у пациентов после первого приступа шизофрении в лобной и височной коре. Учитывая эти данные, можно полагать, что обнаруженное в нашем исследовании изменение амплитуды функции ГО на целевые стимулы указывает на изменение скорости потребления глюкозы в моторной коре больных при предъявлении целевого стимула.

Итак, с помощью фМРТ мы локализовали зону моторной коры, в которой при нагрузке изменяется (Hb)/(dHb). Измеряя интенсивность сигнала NAA в зоне активации в динамике после предъявления целевого стимула, можно оценить, как меняется активность митохондрий нейронов в этом периоде. Мы разработали методику, которая позволяет получать спектры и измерять амплитуду функции ГО при нагрузке в одних и тех же временных точках. Для нормы расчет концентраций метаболитов в динамике показал, что в пределах ошибок для всех соединений, за исключением NAA, концентрации постоянны. Динамика спектральных показателей у тех же пациентов в тех же временных точках без предъявления нагрузки, т.е. в состоянии покоя, отсутствует: концентрации всех метаболитов постоянны.

На рис. 11 представлена динамика NAA для нормы и у больных на ранней стадии шизофрении. В норме NAA в пределах ошибки измерений представляет собой плато вплоть до 9-й секунды, на 12-й секунде NAA достоверно снижается. В отличие от нормы в группе больных NAA имеет постоянные значения в течение всего периода наблюдения. Отсутствие у больных динамики показателя активности митохондрий нейронов NAA и сниженное по сравнению с нормой потребление глюкозы при нагрузке, о чем свидетельствует сниженная амплитуда ФГО, указывают на неэффективность энергетического обмена коры в динамике нагрузки при шизофрении.

Отсутствие изменений (NAA) у больных в динамике нагрузки может быть следствием сниженной активности аспартоацилазы (ASPA). Фермент гидролизует NAA до ацетилкоэнзима А (AcCoA) и аспартата и, согласно последним данным

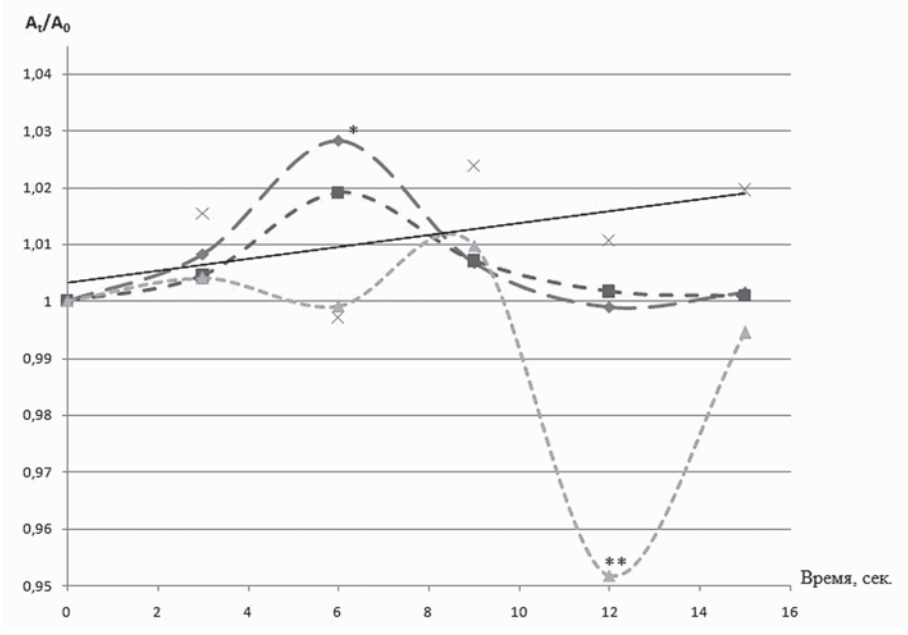


Рис. 11. Функция гемодинамического ответа и динамика NAA в моторной коре мозга (группа нормы) в условиях предъявления целевого слухового стимула. Крупный пунктир – BOLD норма, средний пунктир – BOLD больные, мелкий пунктир – NAA норма, сплошная линия – NAA больные. * $p<0,05$ по сравнению с больными, ** $p<0,05$ по сравнению с первоначальным значением

(Moffet et al., 2011), экспрессируется не только в олигодендроцитах, но и в аксонах. Следовательно, обнаруженное нами в норме обратимое снижение NAA при нагрузке может указывать на функцию NAA как соединение, депонирующее Ac-CoA и высвобождающее его для пополнения энергозатрат при нагрузке. У больных шизофренией постоянство (NAA) в динамике нагрузки указывает на потерю этой функции NAA. Следствием может быть нарушение энергетического обмена коры при нагрузке.

6. Сигнал лактата и предикторы неблагоприятного исхода комы

Совокупность спектральных параметров: интенсивный сигнал Lac, резко сниженная интенсивность сигналов NAA и Cr (на 70% и 60%, соответственно), характеризует гибель клеток. Действительно, Lac накапливается не только при недостатке кислорода и энергетических субстратов, но и при воспалении вследствие накопления анаэробов макрофагов. Потеря NAA в мозге отражает не только снижение уровня функционально активных нейронов, но и их потерю. Падение Cr свидетельствует о резком снижении содержания в ткани целостных нейронов и глиальных клеток, в которых присутствуют креатин и фосфокреатин. В условиях комы наличие перечисленных показателей в спектрах различных структур является предиктором неблагоприятного исхода. На рис. 12 представлен пример примене-

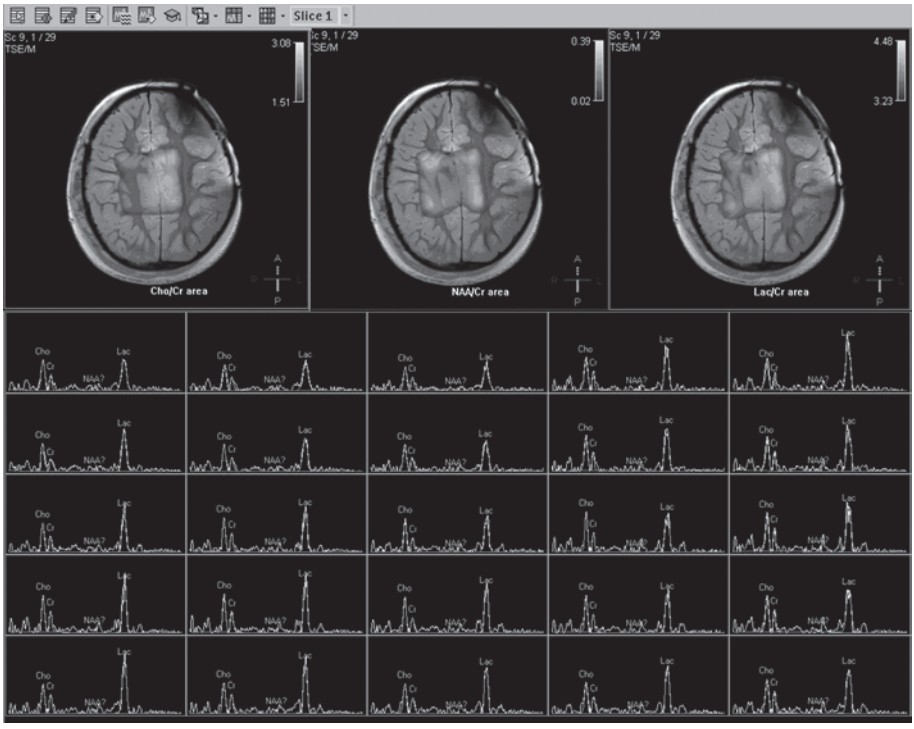


Рис. 12. 2D ^{1}H МР-спектры коматозного больного на 3-и сутки после тяжелой ЧМТ и за 28 суток до смерти. Квадратом выделена зона, в которой получен показанный массив спектров

ния метода двумерной спектроскопии, которая позволяет получить информацию о распределении метаболитов в пределах одного среза, к исследованию коматозного больного на третьи сутки после тяжелой ЧМТ и за 28 суток до смерти. Можно видеть, что в каждом спектре наиболее интенсивным сигналом является Lac, сигнал NAA практически в пределах шума, уровень Cr снижен, его интенсивность составляет 40–45% от исходной.

Накопление Lac приводит к закислению внутриклеточной среды и должно влиять на активность многих ферментов. Анализ литературных данных (The, Hasselbach, 1983, Zonouzi et al., 2006; Emmanuel, Milligan, 1982) показал, что pH-зависимыми являются такие важнейшие ферменты, как фосфофруктокиназа (ФФК), АТФаза, креатинкиназа, лактатдегидрогеназа (рис. 13). Наибольшую зависимость активности от pH наблюдали для ФФК: при снижении pH до 7.0 активность этого фермента снижается до околонулевых значений. ФФК катализирует переход фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-дифосфат. Это вторая реакция гликолитического

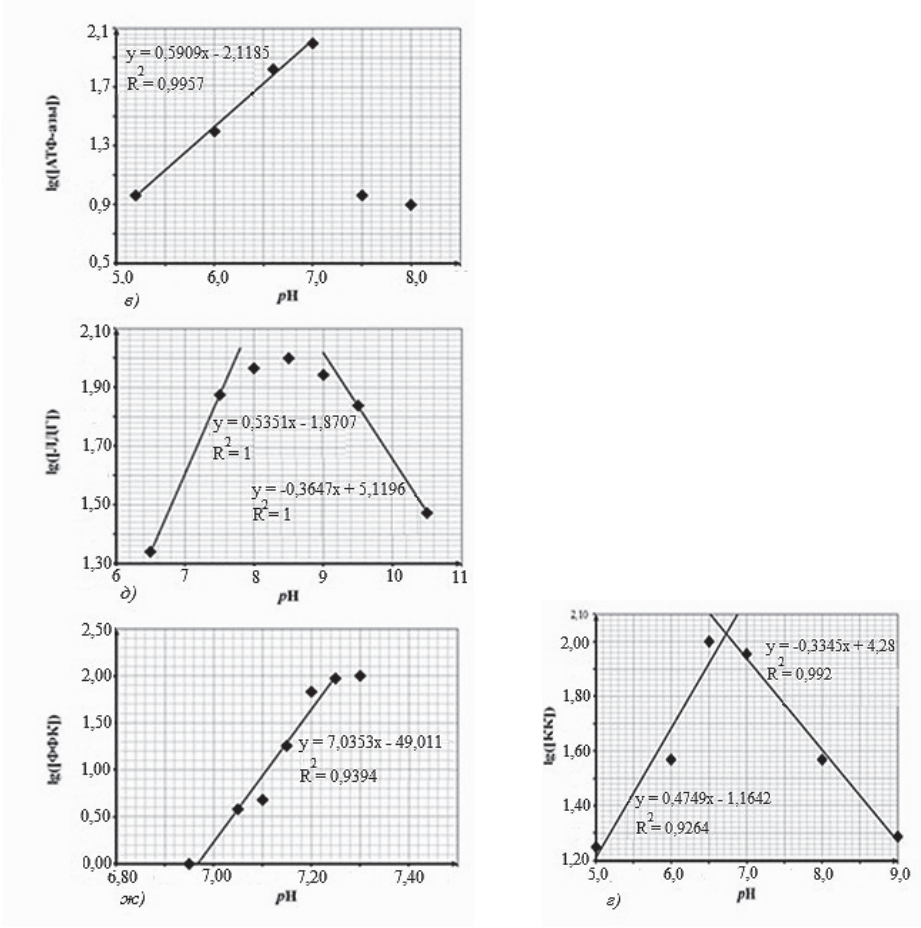


Рис 13. pH-зависимости ферментов. ФФК – фосфофруктокиназа, ЛДГ – лактатдегидрогеназа, КК – креатинкиназа

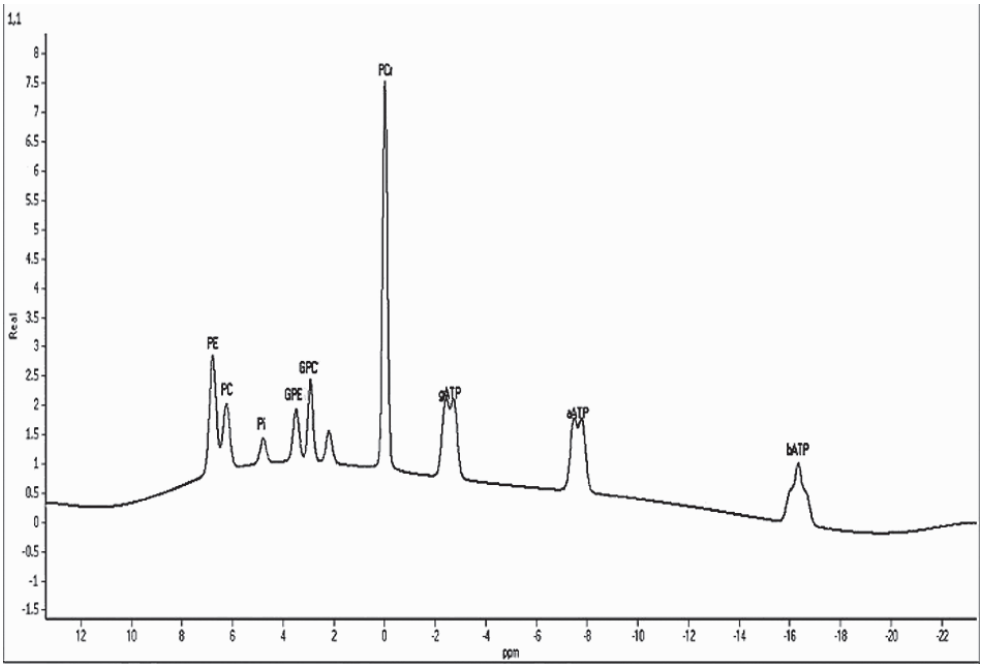


Рис. 14. ^{31}P МР-спектр больного в постгипоксической коме. Поверхностная катушка

пути регулирует весь метаболизм основного для мозга энергетического субстрата – глюкозы. Инактивация ФФК приводит к полному ингибированию гликолиза и прекращению снабжения энергией мозга. Такая ситуация реализуется при диабетической коме. Используя данные о кинетике восстановления pH крови при лечении больных диабетическим кетоацидозом и применив теорию устойчивости, мы смогли оценить пороговую величину pH, при которой лечение становится неэффективным (Луковенков и др., 2013). Важно знать значения pH_{int} у больных в коме, вызванной не только диабетом, и выяснить, какую роль играет концентрация ионов водорода в клетках мозга в функциональных нарушениях.

Метод ^{31}P МРС (рис. 14) позволяет измерять pH_{int}, измеряя значения δ-сигнала неорганического фосфата (Фн). В клетках Фн присутствует в виде ионов $H_2PO_4^-$ и HPO_4^{2-}, концентрации которых находятся в динамическом равновесии. Между обеими ионными формами происходит быстрый обмен протоном. В результате в спектре вместо двух сигналов, соответствующих $H_2PO_4^-$ и HPO_4^{2-}, мы видим усредненный сигнал с химическим сдвигом, величина которого определяется концентрациями каждой ионной формы. Получена формула, позволяющая вычислить pH_{int} в мозге (Petroff, Prichadd, 1983): $pH = 6{,}77 + \lg((\delta Фн - 3{,}29) / (5{,}68 - \delta Фн))$, где δФн – разность значений химических сдвигов сигнала Фн и фосфокреатина (ФК).

Мы измерили pH_{int} в затылочных долях мозга больного, находящегося в коме, вызванной утоплением и получили pH_{int}=6,80. При этом значении pH должен ингибироваться гликолиз, что приводит к нарушению синтеза АТФ и, как следствие, к потере биологической функции.

Литература

Луковенков А.В., Варфоломеев С.Д., Петряйкина Е.Е., Семенова Н.А. Устойчивость стационарных состояний при переменной концентрации ионов водорода в ферментных системах. Приложения к лечению диабетического кетоацидоза // Докл. РАН. 2013. Т. 449. № 3. С. 350-355.

Лундин А.Г., Федин Э.И. ЯМР-спектроскопия. М.: Наука, 1986. 223 с.

Семенова Н.А., Варфоломеев С.Д., Ахадов Т.А., Луковенков А.В. Магнитно-резонансная спектроскопия коры головного мозга человека. Взаимозависимости концентраций ряда ключевых метаболитов // Докл. РАН. 2011. Т. 436. № 6. С. 839-842.

Семенова Н.А., Луковенков А.В., Ахадов Т.А., Сидорин С.В., Варфоломеев С.Д. Нарушения метаболизма и взаимосвязь метаболических процессов в лобно-теменной коре мозга при тяжелой черепно-мозговой травме. Исследование методом локальной 1Н магнитно-резонансной спектроскопии // Биохимия. 2012. Т. 77. Вып. 4. С. 493-500.

Сергеев Н.М. Спектроскопия ЯМР. М.: МГУ, 1981. 279 с.

Ублинский М.В., Семенова Н.А., Ахадов Т.А., Петряйкин А.В., Лебедева И.С., Ефремкин А.Ф., Тюрнева А.С., Каледа В.Г. Характеристики функций гемодинамического ответа в мозге больных шизофренией при выполнении слуховой парадигмы oddball // Докл. РАН. 2013. Т. 453. № 2. С. 218-221.

Baslow M., Guilfoyle D. N-acetylaspartate: a unique neuronal molecule in the central nervous system. Eds. J. Moffet, S. Tieman, D. Weinberger, J. Coyle, A.M.A. Namboodiri. NY: Springer Science, 2006. P. 95-113.

Braissant O., Bachmann C., Henry H. Expression and function of AGAT, GAMT and CT1 in the mammalian brain // Subcell Biochem. 2007. Vol. 46. P. 67-81.

Demougeot C., Marie C., Giroud M., Beley A. N-acetylaspartate: a literature review of animal research on brain ischaemia // J. Neurochem. 2004. Vol. 90. P.

Diehl P., Fluck E., Gunther H., Kosfeld R. , Seeling J. – eds. NMR. Basic principles and progress 28. *In vivo* magnetic resonance spectroscopy III: potential and limitations. Berlin–Heidelberg–NY: Springer-Verlag, 1992. 190 p.

Emmanuel B., Milligan L.P. Can. J. Animal Science. 1982. Vol. 63. P. 55-360.

Fox P.T., Raichle M.E. Focal physiological uncoupling of cerebral blood flow and oxidative metabolism during somatosensory activation in human subject // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986. Vol. 83. P. 1140-1144.

Gunter H. NMR-spectroscopy. John Wiley, 1995. 102 p.

Logothetis N., Wandell B. Interpreting the BOLD signal // Annu. Rev. Physiol. 2004. Vol. 66. P. 735-69.

Magret V., Elkhalil L., Nazih-Sanderson F., Martin F., Bourre J., Fruchart J., Delebart C. Entry of polyunsaturated fatty acids into the brain: evidence that high-density lipoprotein-induced methylation of phosphatidylethanolamine and phospholipase A2 are involved // Biochem. J. 1996. Vol. 316. P. 805-811.

Moffet J. et al. Extensive aspartoacylase expression in the rat central nervous system // Glia. 2011. Vol. 59. № 10. P. 1414.

Petroff A.O.C., Prichadd J.W. Cerebral pH by NMR // Lancet. 1983. Vol. 11. P. 105-106.

Puts N.A.J., Edden R.A.E. In vivo magnetic resonance spectroscopy of GABA: A methodological review // Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. 2012. Vol. 60. P. 29-41.

Ross B., Bluml S. Magnetic resonance spectroscopy of the human brain // The Anatomical Record (new anat.). 2001. Vol. 265. P. 54-84.

Ross B.D., Bluml S., Cowan R. et al. In vivo magnetic resonance spectroscopy of human brain: the tiophisical basis of dementia // Biophys. Chem. 1997. Vol. 68. P. 161-172.

Rothman D., Petroff O., Behar K., Mattson R. Localized 1H NMR measurements of gamma-aminobutyric acid in human brain *in vivo* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. Vol. 90. P. 5662-5666.

Siegel G.J., Agranoff B.W., Albers R.W. et al. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. 6th edition. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.

The R., Hasselbach W. Unsaturated fatty aciod as reactivators of the calcium-dependent ATPase of delipidated sarcoplasmic membrans // Europ. J. Biochem. 1973. Vol. 39. P. 63-68.

Williams S.R., Proctor E., Allen K., Gadian D.G., Crockard H.A. Quantitative estimation of lactate in the brain by 1H NMR // Magn. Reson. Med. 1988. Vol. 7. № 4. P. 425-31.

Zhang J., Chu K., Hazlett E., Buchsbaum M. A study of cerebral glucose metabolism and hemodynamic response in schizophrenia // 4th International Conference on Biomedical Engineering and Informatics. 15-17 Oct. 2011. Vol. 1. P. 77-81.

Zonouzi R., Ashteani S.K., Hosseinkani S., Baharvand H. // J. Biochem. Molec. Biol. 2006. Vol. 39. № 4. P. 426-431.

Влияние острого введения алкоголя на личностные свойства и системную организацию поведения в реальной и виртуальной средах

Б.Н. Безденежных, Ю.И. Александров

Содержание

1. Введение
2. Влияние острого введения алкоголя на личностные свойства, выявляемые с помощью психодиагностических методов
3. Влияние острого введения алкоголя на системные процессы, обеспечивающие выполнение задачи «сенсомоторного выбора»
4. Влияние острого введения алкоголя на предвидение и формирование пространственной памяти в виртуальной среде
5. Заключение

1. Введение

Возможности исследований клинических патологий, возникающих при повреждении гиппокампа, вызванном ишемией, травмами, вирусными и нейродегенеративными заболеваниями, при которых страдает не только хранение и извлечение памяти у человека, но и планирование им будущих ситуаций и действий, а также их мысленное представление, в настоящее время крайне ограничены из-за отсутствия адекватных моделей повреждений гиппокампа у человека. Мы проверяли предположение о том, что адекватной моделью клинической патологии, обусловленной повреждением гиппокампа, выступает действие острых доз алкоголя. Это предположение было основано на результатах наших исследований, демонстрирующих, что острое введение алкоголя избирательно блокирует нейроны систем, сформированных на сравнительно более поздних этапах индивидуального развития, причем к наиболее подверженным эффектам алкоголя структурам мозга относятся структуры гиппокампального круга (Alexandrov et al., 1990, 1991, 1993, 1997, 1998, 2000, 2001, 2009, 2013; Laukka et al., 1997). Проверка данного предположения включала проведение следующих серий эксперимента. В первой из них проверяли, оказывает ли алкоголь генерализованный эффект на мозговое обеспечение деятельности человека или его эффекты основаны, как это можно предположить из цитированных выше работ, на избирательном действии алкоголя на нейронные структуры. Во второй – выясняли, на какие именно системные процессы, лежащие в основе осуществления поведения в задаче «сенсомоторного выбора» влияет острое введение

Сокращения: АС – афферентный синтез; ОПФ – опросники «Пять факторов»; ОСТ – опросник структуры темперамента; По – подвижность нервной системы; ПТО – Павловский темпераментальный опросник; СВ – сила возбуждения нервной системы; ССП – связанные с событием потенциалы; СТ – сила торможения нервной системы; ЭЭГ – электроэнцефалограмма.

алкоголя. В третьей, основываясь на полученных в упомянутых сериях результатах, разрабатывали новый, основанный на применении погружения испытуемого в виртуальную среду метод оценки клинического нарушения гиппокамп-зависимой памяти и оценивали влияние острого введения алкоголя на прогнозирование и научение человека в данной виртуальной среде.

2. Влияние острого введения алкоголя на личностные свойства, выявляемые с помощью психодиагностических методов

О действии алкоголя на организм и на психические процессы существует значительное разнообразие мнений. Предполагается, что алкоголь подавляет непроизвольное внимание (Jääskeläinen et al., 1999), пространственную память (Matthews, Silvers, 2004), информационные процессы (Tzambazis, Stough, 2000). При этом исследования часто приводят к противоречивым результатам. Так, традиционные поведенческие исследования влияния алкоголя на информационные процессы привели некоторых авторов к выводу, что алкоголь не влияет избирательно на какие-то определенные стадии информационных процессов, а просто замедляет все информационные процессы, а другие авторы считают, что алкоголь нарушает только некоторые стадии информационных процессов (Matthews, Silvers, 2004). Одни авторы считают, что алкоголь влияет на центральные процессы, связанные с действием, но не влияет на процессы восприятия и выбора ответа (Huntley, 1974). По данным других авторов, алкоголь нарушает исполнительные процессы (Matthews, Silvers, 2004). Считается, что выявляемые в подобных экспериментах нарушения организации действий определяются прямым действием алкоголя на метаболические процессы в нервных клетках (McGough et al., 2004). Однако такое заключение не устраняет вопрос о том, каковы механизмы опосредованного (непрямого) действия алкоголя на поведение и характеризующие поведение психические процессы?

Первой нашей задачей было выяснение вопроса о том, является ли действие алкоголя генерализованным. Мы исходили из следующего предположения. Одним из наиболее существенных факторов, опосредующих выбор испытуемым ответа на тестовые задания в личностных психодиагностических методах, является структура индивидуального опыта субъекта, проходящего тестирование. Если алкоголь вызывает генерализованные воздействия на упомянутую структуру, то его эффект, несомненно, должен проявиться в кардинальных изменениях свойств целостной личности, выявляемых тестированием. С целью проверки данного предположения мы проанализировали результаты психодиагностического обследования испытуемых в нормальном состоянии и в состоянии алкогольного опьянения при пероральном приеме 20-процентного раствора алкоголя из расчета 1 мл 96-процентного этанола на 1 кг веса.

Психодиагностическое тестирование осуществлялось у испытуемых в нормальном состоянии и в состоянии алкогольного опьянения при помощи «Павловского темпераментального опросника» (ПТО), опросников «Пять факторов» (ОПФ) и структуры темперамента (ОСТ) по схеме тест–ретест с интервалом 3–6 месяцев.

С помощью «Павловского темпераментального опросника» (Бодунов и др., 1997) оценивались основные (Павловские) свойства нервной системы, лежащие в основе индивидуально-психологических различий. Опросник содержит три шкалы, измеряющие силу возбуждения нервной системы (СВ), силу торможения нервной системы (СТ) и ее подвижность (По). Каждая шкала включает 21 высказывание.

Опросник «Пять факторов» (П.Т. Коста и Р.Р. МакКрей, адаптирован М.В. Бодуновым) позволяет оценивать пять наиболее общих свойств личности: нейротизм (Н), экстраверсию (Э), открытость к новому опыту (О – Openness), соглашательство (С – Agreeableness) и добросовестность (Д – Conscientiousness). Эти свойства были выделены эмпирически в психолексическом исследовании. Каждое свойство оценивается при помощи 12 высказываний, к которым испытуемый должен определить свое отношение по 5-балльной шкале.

Опросник структуры темперамента (ОСТ) (Бодунов и др., 1997) предназначен для оценивания важнейших психодинамических свойств индивидуального поведения в предметной и коммуникативной сферах. Он включает следующие шкалы: эргичность предметная (Эр) – склонность к напряженной предметной деятельности; эргичность социальная (Сэр) – склонность к активному общению; пластичность предметная (П) – склонность к разнообразию в предметной деятельности; пластичность социальная (СП) – склонность к разнообразию в общении; скорость/темп предметная (Т) – индивидуальный темп предметных действий; скорость/темп социальная (СТ) – индивидуальный темп коммуникативных действий; эмоциональная чувствительность предметная (Эм); эмоциональная чувствительность социальная (Сэм). Каждая шкала включает 12 вопросов. Тест содержит также контрольную шкалу, оценивающую тенденцию респондента давать социально желательные ответы на тестовые задания.

Анализ структурных связей между полученными шкальными оценками проводился при помощи метода линейных структурных уравнений (Бодунов и др., 1997). При анализе результатов тестирования производилось сравнение средних значений шкальных оценок изучаемых свойств индивидуальности у испытуемых в разных состояниях (К – норма и Э – алкогольное опьянение; табл. 1).

Действие алкоголя было сопряжено с ростом силы нервной системы и повышением эмоциональной чувствительности. При этом структура связей между данными компонентами темперамента существенно не изменялась.

Таблица 1

Матрица корреляций между значениями выделенных шкал в экспериментальном (э) и контрольном (к) состояниях

Шкалы	СВ-э	Н-э	Сэм-э	СВ-к	Н-к	Сэм-к
СВ-э	1,00	-.50**	-.51**	,86**	-.57**	-.48**
Н-э		1,00	,62**	-,46**	,77**	.48**
Сэм-э			1,00	-,53**	57**	.73**
СВ-к				1,00	-65**	-.56**
Н-к					1,00	71 **
Сэм-к						1,00

Таким образом, можно предположить, что острое действие данной дозы алкоголя не приводит к генерализованным изменениям структуры индивидуального опыта и перейти к решению следующей проблемы: к выяснению вопроса о том, на какие именно системные процессы влияет острое введение алкоголя.

3. Влияние острого введения алкоголя на системные процессы, обеспечивающие выполнение задачи «сенсомоторного выбора»

Мы считаем, что эффективное решение сформулированной выше проблемы возможно с позиций системно-эволюционного подхода, развивающего теорию функциональных систем П.К. Анохина и рассматривающего физиологические (в том числе нейронную активность) и психические закономерности как разные аспекты описания единой реальности – актуализации взаимодействующих функциональных систем, составляющих структуру индивидуального опыта. Согласно этому подходу, в течение всей жизни организма при формировании нового опыта некоторые нейроны, проходя при системогенезе процесс специализации в отношении вновь формируемой функциональной системы, объединяются в группы, которые составляют мозговой эквивалент системы – элемент индивидуального опыта. По-видимому, нейроны системоспецифичны, их специализация, сформированная при обучении, пожизненна (Швырков, 1988).

Следует отметить, что каждая функциональная система формируется для достижения конкретного результата, необходимого организму на определенном этапе развития и жизнедеятельности. Причем появляющиеся при научении системы не вытесняют, не заменяют ранее сформированные системы, а добавляются к ним, формируясь на основе и во взаимодействии с системами предшествующего опыта и проявляясь как вновь приобретенный опыт (Анохин, 1978; Пономарев, 1982; Швырков, 1988). Фактическим подтверждением сказанного, кроме многочисленных данных, полученных при регистрации нейронной активности в нашей и других лабораториях (Александров, 2009, 2011, 2012), является развитие антероградной амнезии, т.е. невозможности формирования нового опыта при нарушении прошлого опыта в связи с ретроградной амнезией (Squire, Alvarez, 1995), а также восстановление памяти при выходе из ретроградной амнезии в той последовательности, в которой она формировалась.

Реализация же индивидуального опыта в виде определенной формы поведения и характеризующих его психических процессов обеспечивается активностью целого набора функциональных систем в их взаимодействии. Эта позиция согласуется с выводом, к которому пришел на основании анализа результатов многочисленных психологических экспериментов У. Найсер: «…когнитивную активность человека более целесообразно рассматривать как совокупность приобретенных навыков, чем как функционирование единого постоянного в отношении своих возможностей механизма» (Найсер, 1981, с. 107).

Объединение систем обеспечивается, в частности, синаптическими связями между нейронами этих систем. Причем, как было показано, синаптические связи

между нейронами внутри системы более устойчивы к внешним воздействиям, чем связи между нейронами разных систем, что, видимо, позволяет системам «выходить» из одного набора систем и включаться в другие наборы (Безденежных, 2004). Отметим, что ранее нами было показано, что алкоголь оказывает выраженное угнетающее влияние на межсистемные отношения (Alexandrov et al., 1993).

Межсистемные отношения формируются в связи с процессом объединения систем в целостную организацию, обеспечивающую реализацию действия. Это объединение систем для реализации действия происходит во время афферентного синтеза (АС) (Безденежных, 2004). На данной стадии развертывания поведения нейроны головного мозга получают самые разные афферентные влияния, и на этой стадии «организм решает три важнейших вопроса: что делать, как делать, когда делать?» (Анохин, 1978, с. 267). Во время афферентного синтеза нейроны, принадлежащие разным системам текущего и будущего действия, вступают в связи через синаптические контакты, чему, по мнению некоторых авторов, способствует синхронная активность этих нейронов (Riehle et al., 1997; Desmurget et al., 1998; Averbeck et al., 2002 и др.). На основании вышесказанного мы предполагаем, что алкоголь, изменяя активность нейронов, может опосредованно влиять на их способность объединяться во время АС.

Возникает вопрос, как можно контролировать АС в экспериментальном исследовании? Известно, что при выполнении сенсомоторных задач выбора в электроэнцефалограмме развивается связанный с ответом многокомпонентный потенциал, в котором наиболее выраженным является позитивный компонент (потенциал) – Р300. Этот потенциал манифестирует развитие АС (Безденежных, 2004). Дело в том, что Р300 чувствителен к целому ряду составляющих АС – прогнозированию будущих сигналов, проявляющихся в эффекте последовательности (Donchin, Coles, 1988; Munson et al., 1984; Verleger, 1991), уровню мотивации (Johnson, 1986), объему извлекаемого из памяти материала (Mecklinger et al., 1994), физиологическому состоянию организма (Geisler, Polich, 1990). Характеристики Р300 также коррелируют со степенью сложности принимаемого решения и выполняемой задачи (Coles et al., 1988; Ullsperger et al., 1988; Palmer et al., 1994). Более того, в диапазоне развития Р300 субъект проявляет максимальную чувствительность к внешним раздражителям, что характерно для стадии афферентного синтеза. Данный феномен был подтвержден многочисленными экспериментальными данными, полученными методом «вторичного ответа». Суть этого метода заключается в том, что во время подготовки к ответу на основной сигнал, предъявляемый испытуемому в случайном порядке и с определенной частотой, предъявляют еще один сигнал, вторичный, в ответ на который нужно прервать текущее действие и совершить другой ответ (вторичный ответ). В одном из экспериментов вторичный сигнал предъявляли во время ответа на основной сигнал в интервале от 260 до 409 мс после его предъявления. Оказалось, что время «вторичного ответа» зависит от момента предъявления тестирующего сигнала в исследуемом интервале (Woodward et al., 1991). Эта зависимость проявляется в виде U-образной кривой, пик которой, то есть минимальное время «вторичного ответа», имеет место при ответе на сигнал, предъявленный примерно через 300 мс после начала развития текущего ответа.

Все сказанное свидетельствует в пользу нашего предположения о том, что алкоголь оказывает свое опосредованное влияние на системные процессы на стадии афферентного синтеза, тем более что существуют также и экспериментальные данные о влиянии введения алкоголя на характеристики Р300 (Grillon et al., 1995; Polich, Bloom, 1999; Jääskeläinen et al., 1999 и др.). Итак, задача 2-го этапа работы заключалась в проверке предположения о том, что алкоголь оказывает влияние на межсистемные отношения на этапе АС.

В данной работе регистрировали Р300, а также оценивали точность прогнозирования субъектом предъявляемых ему с равной вероятностью двух альтернативных сигналов и ЭП, указывающий на перестройку связей между системами.

Одной из составляющих АС является прогнозирование субъектом будущих внешних событий (сигнала). Прогнозирование особенно явно проявляется в задачах выбора отчетного действия в связи с предъявлением того или иного альтернативного сигнала. Для контроля над прогнозированием необходима экспериментальная процедура, в которой можно было бы манипулировать субъективной оценкой вероятностного распределения альтернативных сигналов. Обычно для такой манипуляции используют традиционную процедуру «случайного шара» (oddball paradigm), в которой один из сигналов предъявляется значительно реже, чем другой. Однако в такой процедуре имеет место эффект повторения. Он проявляется в том, что время ответа и его дисперсия на часто предъявляемый сигнал сокращаются быстрее, чем на редкий сигнал, т.е. ответ на часто предъявляемый сигнал совершенствуется быстрее, чем на редкий альтернативный сигнал (LaBerge, Tweedy, 1964; Bertelson, Tisseyre, 1966). Соответственно, по-разному меняются и характеристики Р300, связанные с ответами на эти сигналы (Courchesne, 1978). Для исключения такого неравномерного совершенствования выполнения альтернативных ответов необходимо, чтобы оба сигнала предъявлялись с равной вероятностью. Следовательно, при решении такой задачи мы должны были манипулировать только субъективной оценкой вероятности появления сигналов при сохранении их равновероятного предъявления.

При многократных выполнениях задачи выбора имеет место совершенствование выполнения ответов, что проявляется в эффекте последовательности, т.е. влиянии нескольких предшествующих сигналов на время текущего ответа, сокращении времени ответа на предъявление сигналов и снижении числа ошибочных отчетных действий (Безденежных, 2004). Несомненно, что это связано с изменением формирования связей между системами во время АС. В таком случае, если алкоголь влияет на процессы АС, то он будет влиять и на совершенствование навыка выполнения задачи. Поэтому в эксперименте мы контролировали субъективную вероятность предъявления того или иного альтернативного сигнала и совершенствование навыка выполнения ответов на эти сигналы.

Методика «сенсомоторного выбора» Экспериментальная процедура состояла из двух этапов. На первом, контрольном, этапе участвовало 70 трезвых испытуемых (32 – женского и 38 – мужского пола) в возрасте от 18 до 37 лет. Этот этап состоял из 6 экспериментальных серий моторных ответов на предъявление зрительного сигнала. Испытуемый сидел перед монитором, средний и указательный пальцы его

доминантной руки находились соответственно на клавишах «1» и «2» клавиатуры. В 1-й серии ему предъявляли один и тот же сигнал, в ответ на который он должен был нажимать одну и ту же клавишу отчета (КО) – простой ответ. Во 2-й серии ему предъявляли другой сигнал, и он в ответ нажимал другую КО – простой ответ. В 3–6-й сериях – в задачах сенсомоторного выбора – эти сигналы предъявлялись в случайном порядке и с равной вероятностью. Испытуемый должен был отвечать нажатием одной из двух КО в зависимости от того, какой из двух альтернативных сигналов был предъявлен. В каждой серии испытуемым предъявлялось примерно по 30 альтернативных сигналов. Во всех сериях испытуемый должен был нажимать КО как можно быстрее после предъявления сигнала.

В экспериментах была применена определенная структура альтернативных сигналов (назовем их сигналы «А» и «Б»). Каждый сигнал состоял из: (1) предупреждающего сигнала (ПрС) – появление вертикальной светлой полоски в центре экрана, которая через (2) определенный интервал времени (Инт) заменялась (3) пусковым сигналом (ПуС) – уменьшением или увеличением высоты этой полоски. Продолжительность ПуС составляла 50 мс. ПрС являлся общим для обоих сигналов. Интервал (Инт) для сигнала «А» составлял 700 мс, а для сигнала «Б» – 950 мс. Разница между этими интервалами в 250 мс превышает на 100 мс средний порог различения длительности временных интервалов (Скотникова, 1999). В эксперименте испытуемые оценивали сигналы «А» и «Б» по физическим характеристикам их ПуС и как можно быстрее нажимали КО, соответствующую предъявленному ПуС (рис. 1). Время от момента предъявления ПуС до нажатия соответствующей КО мы рассматривали как время ответа. Каждый ПрС очередного сигнала предъявлялся через 1,5 с после нажатия КО в предшествующем ответе. Разница между интервалами в 250 мс в альтернативных сигналах может служить скрытой подсказ-

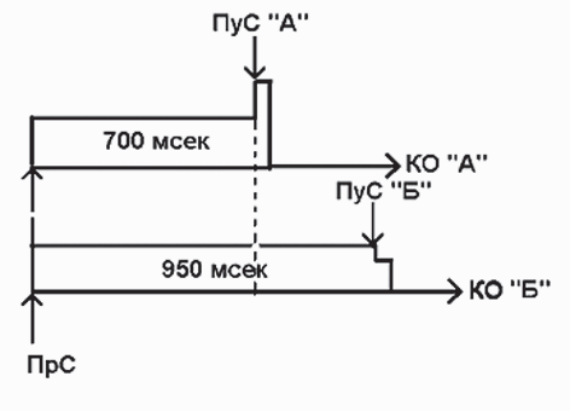


Рис. 1. Схема альтернативных сигналов «А» и «Б»

Вертикальные стрелки, указывающие вверх – начало предъявления предупреждающего сигнала (ПрС). Вертикальные стрелки, указывающие вниз – начало предъявления пускового сигнала (ПуС «А» и ПуС «Б»). Горизонтальные стрелки – ответы нажатием клавиш отчета (КО «А» и КО «Б»).

Для одной половины испытуемых высота полоски ПуС для «А» и «Б» показана на рисунке, для другой половины испытуемых высота этой полоски для сигнала «Б» была больше, чем для сигнала «А»

кой о появлении ПуС сигнала «Б» и тем самым увеличивать вероятность прогнозирования сигнала «Б» по сравнению с сигналов «А».

У испытуемых во время эксперимента регистрировали: а) монополярно электроэнцефалограмму (ЭЭГ) хлорсеребряными электродами с областей черепа F3, F4, Cz, P3, P4 по международной системе 10/20 с частотой опроса 250 Гц, в диапазоне частот от 0.1 до 70 Гц; в качестве индифферентных электродов служили объединенные электроды, прикрепленные к мочкам ушей; сопротивление контактов череп–электроды не превышало 5 кОм; б) вертикальную составляющую электроокулограммы для контроля над артефактами от движений глаз в ЭЭГ; в) время ответов (интервал от момента предъявления ПуС до момента нажатия КО); г) правильность ответа – нажатие КО, соответствующей или не соответствующей предъявленному ПуС. Кроме того, испытуемые давали свободный отчет о том, совершали ли они ошибочные нажатия КО, а также, на какой сигнал, «*А*» или «*Б*», было легче отвечать, и заметили ли они различия в Инт этих сигналов.

В «алкогольной» серии экспериментальная процедура была такой же, как на трезвых испытуемых. После наложения электродов испытуемые выпивали 20-процентный раствор этанола из расчета 1 мл 96-процентного этанола на 1 кг веса. Как было обнаружено нами ранее, прием алкоголя в этой дозе, обеспечивающей угнетение активности нейронов, принадлежащих к наиболее дифференцированным системам, а также межсистемных отношений у животных (Alexandrov et al., 1990, 1993) приводит к достоверным изменениям параметров отчетного поведения разного типа и повышению эмоциональности у испытуемых (Бодунов и др., 1997; Alexandrov et al., 1998; Laukka et al., 1997). Эксперимент по выполнению задачи выбора начинался по достижении в крови максимальной концентрации алкоголя, определяемой с помощью алкометра (RK-1100, Япония). 26 здоровых испытуемых (10 женского и 16 мужского пола в возрасте от 22 до 35 лет), имеющих опыт алкогольного опьянения, участвовали в обеих сериях с интервалом 3 месяца. Ни один из испытуемых не ощущал какого-либо дискомфорта после приема алкоголя ни во время эксперимента, ни после него. В основном испытуемые ощущали чувство эйфории и сонливости (Alexandrov et al., 1998). Испытуемые участвовали в экспериментах как в нормальном состоянии, так и в состоянии алкогольного опьянения с интервалом 4–6 месяцев. Последовательность экспериментов для каждого испытуемого выбиралась в случайном порядке.

Обработка данных заключалась в следующем. Отдельно для ответов на альтернативные сигналы рассчитывали медиану времени ответов по каждой серии. Для выявления эффекта последовательности на время ответов вычисляли медианы времени ответов, завершающих определенные цепочки последовательностей сигналов – АА*А*, БА*А*, АБ*А*, ББ*А* для ответа на сигнал «*А*» и ББ*Б*, АБ*Б*, БА*Б*, АА*Б* для ответа на сигнал «*Б*». Эти медианы распределяли по 4 возрастающим рангам. Между рангами по всей выборке группы проводили дисперсионный анализ (ANOVA). Ранее нами было показано, что ЭП имеет место при совершенствовании навыка выполнения задачи сенсомоторного выбора (Безденежных, 2004).

Связанные с событием потенциалы (ССП) получали выборочным усреднением безартефактных фрагментов ЭЭГ, связанных с ответом на один и на другой

сигнал для каждой экспериментальной серии отдельно. Усреднение проводилось от момента предъявления ПуС по 1 с в обе стороны от этой референтной точки. Значения амплитуды и латентного периода пика компонента Р300 в усредненных ССП, а также время отчетных действий обрабатывались с помощью статистических методов из лицензионного пакета SPSS 11.0 (использовались дисперсионный анализ, парные сравнения по t-критерию, метод главных компонент). Сравнение этих показателей между «алкогольной» и контрольной сериями было проведено с использованием t-критерия Стьюдента.

Из 70 контрольных испытуемых, участвовавших на первом этапе экспериментов, результаты по 4 испытуемым были исключены из анализа по разным причинам – большое количество артефактов в ЭЭГ, утомление, большое количество ошибок, нежелание продолжать работу. По целому ряду причин, это – многочисленные артефакты в ЭЭГ, периодические засыпания во время эксперимента, чрезмерное возбуждение, проявляющееся в попытках разговаривать с экспериментатором и комментировать собственные действия и т.д. – из «алкогольной» группы мы взяли для анализа данные, полученные у 14 испытуемых.

Простые ответы. Сравнения по t-критерию для парных случаев медиан времени ответа показали, что время простого ответа не зависит от длины интервала между ПрС и ПуС (t=0,318, df = 48, p=0,683). В потенциалах, связанных с простыми ответами, в отличие от ответов в задаче выбора, отсутствовал компонент Р300 (рис. 2).

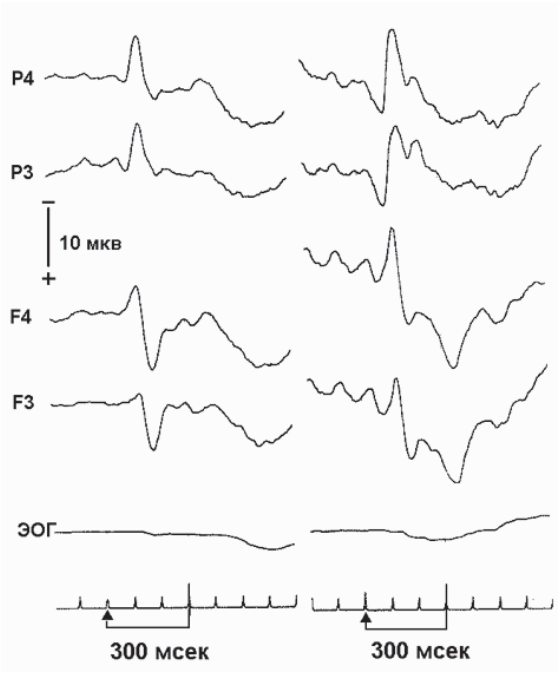


Рис. 2. ЭЭГ – потенциалы в лобных (F3 и F4) и теменных (P3 и P4) областях, связанные с простыми ответами (n=50) (левый столбик) и с ответами в задаче выбора (n=56) (правый столбик)

Стрелками обозначены моменты предъявления ПуС (исп. АВН)

Алкоголь не изменял время простых ответов. Сравнение по t-критерию для парных случаев показало, что испытуемые с одинаковой скоростью выполняли задачу как в нормальном состоянии, так и в состоянии алкогольного опьянения. Различия во времени ответа составляли: для ответа на сигнал «А» – t=1,883, df=13, p=0,082; для ответа на сигнал «Б» – t=1,732, df=13, p=0, 09.

Дифференцированные ответы (серии пронумерованы, как 1, 2, 3, 4 без учета двух предшествующих серий простого ответа). Как мы и предполагали, время ответа на сигнал «Б» было достоверно короче времени ответа на сигнал «А» по всему эксперименту и составляло соответственно 315,8±67,7 мс и 376,6±62,5 мс (различие достоверно, t=12,113, df=116, p=0,000) (рис. 3).

Тренировка. Для проверки влияния тренировки на время альтернативных ответов был применен дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим множественным сравнением по Шеффе. Сравнивались медианы времени ответов между сериями у 66 испытуемых. Результаты показали, что при тренировке достоверно сократилось время ответов только на сигнал «Б» (F=10,183, df=3,197, p=0,000); время ответов на сигнал «А» имело тенденцию к сокращению (F=1,046, df =3,197, p=0,185). Как мы уже отмечали, в задачах выбора, в которых альтернативные сигналы предъявляются с разной вероятностью, быстрее совершенствуется то действие, которое связано с более частым, а следовательно более вероятным для субъекта сигналом (LaBerge, Tweedy, 1964; Bertelson, Tisseyre, 1966). Следует добавить, что по отчетам испытуемых им было легче отвечать на сигнал «Б» («палец нажимает сам»). Эти факты можно объяснить тем, что у испытуемых был более высокий уровень готовности отвечать на сигнал «Б», чем на сигнал «А». Эта готовность связана с тем, что испытуемые примерно через 700 мс после ПрС, если не было пускового сигнала «А», корректируют свой прогноз и ожидают пусковой сигнал «Б».

Эффект последовательности. Как видно из табл. 2, ЭП на время ответов, связанных с сигналом «Б», исчезает уже в 3-й серии эксперимента, тогда как этот эффект сохранялся в течение всех серий на время ответов, связанных с сигналом «*А*». Это указывает на то, что совершенствование ответа на сигнал «Б» завершилось раньше, чем совершенствование ответа на сигнал «А».

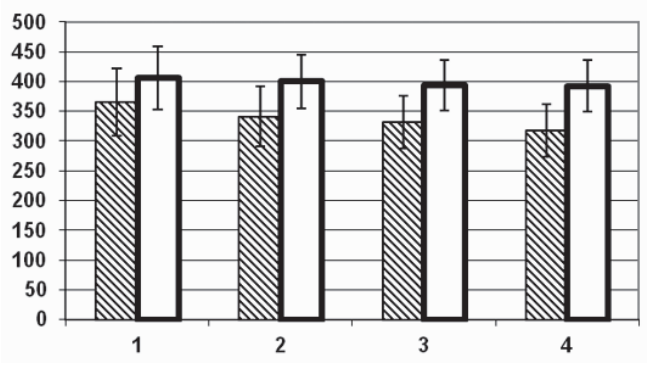


Рис. 3. Сравнение медиан времени ответа в четырех последовательных сериях на сигналы «А» (не заштрихованный столбик) и сигнал «Б» (заштрихованный столбик)

По вертикали – время в мс, по горизонтали – серии экспериментов

Таблица 2

Эффект последовательности на время ответа в четырех сериях задачи выбора (ANOVA)

Серия / ответ на сигнал	Df	F	Sig.
1 / «А»	3 / 260	3, 421	0, 019*
1 / «Б»	3 / 260	3, 112	0, 029*
2 / «А»	3 / 260	4, 025	0, 009*
2 / «Б»	3 / 260	3, 301	0, 023*
3 / «А»	3 / 256	2, 756	0, 033*
3 / «Б»	3 / 256	1, 177	0, 318
4 / «А»	3 / 196	3, 608	0, 011*
4 / «Б»	3 / 196	1, 136	0, 334

* – различия достоверные.

Известно, что чем больше неопределенность относительно будущего сигнала, тем более выражен ЭП на это действие (Donchin, Coles, 1988), и наоборот, при подсказке, указывающей на очередной сигнал в задаче выбора, ЭП на характеристики ответа на этот сигнал исчезали (Munson et al., 1984; Verleger, 1991). Следовательно, проиллюстрированные в табл. 2 факты также являются подтверждением того, что субъект значительно чаще безошибочно прогнозировал сигнал «Б», чем сигнал «А».

Позитивный компонент ССП – Р300. Р300, связанный с ответом, развивается до нажатия КО. Этот факт и результаты исследований других авторов дают основание утверждать, что последовательные действия перекрываются. При этом АС последующего действия и сопровождающий их Р300 осуществляются во время текущего действия, а именно – в переходный период от распознавания сигнала к исполнению отчетного действия (Безденежных, 2004).

Очевидно, что в случае совпадения предъявленного сигнала с прогнозируемым сигналом при распознавании сигнала будет отсутствовать фаза рассогласования. В таком случае переход от распознавания к реализации исполнительной фазы акта должен осуществляться раньше, чем в тех случаях, когда имеет место рассогласование прогнозируемого и предъявленного сигналов. Согласно нашей гипотезе, это должно отразиться на латентном периоде Р300: он должен быть короче у Р300, связанного с ответом на сигнал «Б», нежели у Р300, связанного с ответом на сигнал «А». Данное предположение подтверждается: было обнаружено, что латентный период пика Р300, связанного с ответами на сигнал «Б», короче, а амплитуда больше, чем эти характеристики Р300, связанного с ответами на сигнал «А» (рис. 4).

На рис. 4 видно, что передний фронт более негативен, а латентный период пика больше у Р300, связанного с ответом на сигнал «А», чем у Р300, связанного с ответом на сигнал «Б».

По критерию Вилкоксона, общие различия между латентными периодами и амплитудами пиков Р300, связанных с ответами «А и «Б», достоверны и составляют соответственно: N=344, Z=7,860, p=0,000 и N=344, Z=2,404, p=0,016. Кроме того, оказалось, что передний фронт Р300 (или позитивное отклонение между пиками N200 и Р300) в ответе на сигнал «А» развивается более негативно, чем в ответе на сигнал «Б». Этот негативный сдвиг, доходя до пика Р300, соответственно снижает и амплитуду Р300. Именно по этой причине амплитуда Р300, связанного с

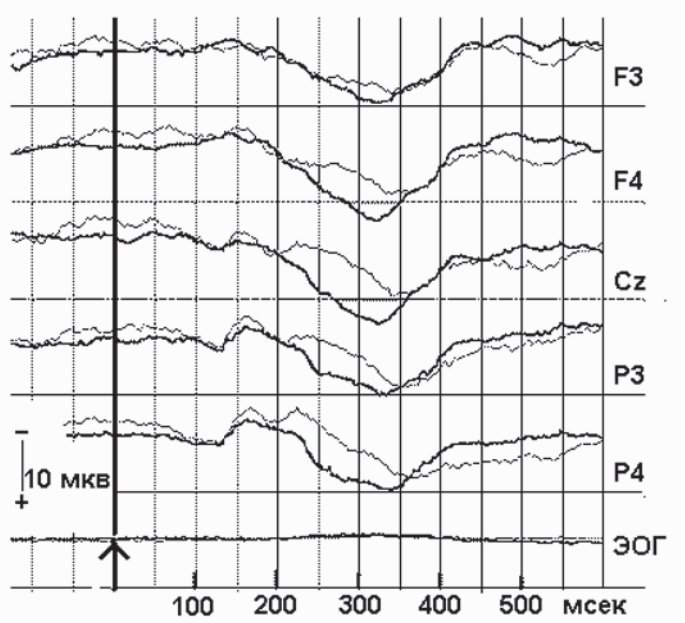


Рис. 4. Пример потенциалов, связанных с ответами на сигнал «Б» (толстая линия) и на сигнал «А» (тонкая линия) (Испытуемый SOZ)

На рисунке видно, что передний фронт развивается более негативно, а латентный период пика больше у Р300, связанного с ответом на сигнал «А», чем у Р300, связанного с ответом на сигнал «Б»

ответом на сигнал «А», меньше амплитуды Р300, связанного с ответом на сигнал «Б». Эти различия между потенциалами, связанными с ответами на сигналы «А» и «Б», подтверждаются при анализе общего усредненного потенциала методом главных компонент. Дисперсия переднего фронта описывается фактором, пик волны которого приходится на интервал 250 мс после ПуС (рис. 5). Этот фактор связан с совершенствованием навыка выполнения задачи выбора.

Сходный фактор был выявлен в ряде работ, в которых исследовались ССП при разных нарушениях в действиях, связанных с расстройствами психики (Bruder et al., 2002).

Влияние алкоголя на дифференцированные ответы в первой серии задачи выбора. Алкоголь не влиял на время дифференцированных ответов в первой серии задачи выбора. Различия между временем отчетных действий, выполняемых в нормальном состоянии и в состоянии алкогольного опьянения в этой серии, составляли: для отчетного действия на сигнал «А» – t=-0,274, df=13, p=0,789; для отчетного действия на сигнал «Б» – t=-0,254, df=13, p=0,804.

Для дополнительной проверки полученного факта время отчетных действий в первой серии, выполняемых испытуемыми в состоянии алкоголизации, сопоставлялись со временем отчетных действий в первой серии задачи выбора у случайно выбранных 14 испытуемых из выборки первого этапа эксперимента, проводившегося с участием трезвых испытуемых. Дисперсионный анализ показал, что время

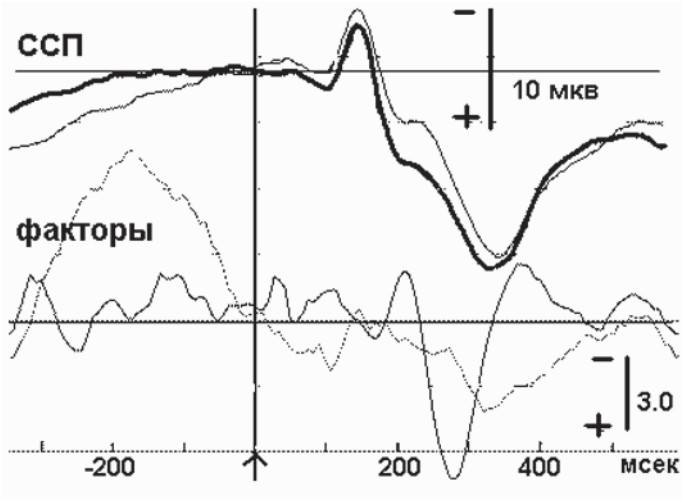


Рис. 5. Общие усредненные потенциалы, связанные с ответами на сигнал «А» (тонкая линия) и сигнал «Б» (жирная линия), и факторы, описывающие дисперсию этих потенциалов

Потенциалы усреднены по схеме 5 отведений×4 серии×70 испытуемых. Как видно из рисунка, максимальные различия между двумя потенциалами имеют место за 180 мс до пускового сигнала и через 280 мс после этого сигнала. Момент предъявления пускового сигнала обозначен стрелкой

отчетных действий в первой серии выполнения задачи выбора между группами не отличаются ни для отчетных действий на сигнал «А» (df=2/39, F=0,046, p=0,955), ни для отчетных действий на сигнал «Б» (df=2/39, F=0,314, p=0,733).

Таким образом, при выполнении данной задачи алкоголь в эйфорической дозе не влияет на исходную скорость выполнения обеих форм отчетных действий, имевшую место до совершенствования навыка выполнения задачи выбора.

Влияние алкоголя на время отчетных действий в процессе тренировки выполнения задачи выбора. Как видно из табл. 3, у испытуемых в состоянии алкогольного опьянения, в отличие от испытуемых, находившихся в нормальном состоянии, в процессе тренировки не было достоверного сокращения времени отчетных действий даже на сигнал «Б». Напомним, что этот сигнал имел значение скрытой подсказки, которая способствовала сокращению времени отчетного действия на этот сигнал.

Таблица 3

Сравнение влияния тренировки на время отчетных действий в четырех последовательных сериях у испытуемых в нормальном состоянии (Норм) и в состоянии алкогольного (Алк) опьянения

Состояние	Ответ на сигнал	Сравнение по ANOVA		
		Df	F	Sig
Норм	«А»	3,52	0,161	0,922
Норм	«Б»	3,52	3,294	0,028*
Алк	«А»	3,52	0,425	0,736
Алк	«Б»	3,52	1,081	0,366

* – различия достоверны

Таблица 4

Сравнение эффекта последовательности на время отчетных действий в четырех последовательных сериях у испытуемых в нормальном (Норм) состоянии и в состоянии алкогольного (Алк) опьянения

Серия / Ответ на сигнал	Сравнение по ANOVA	
	df	F
		Норм / Алк
1 / «А»	3/52	3,199* / 0,336
1 / «Б»	3/52	2,732 / 0,226
2 / «А»	3/52	3,163* / 0,489
2 / «Б»	3/52	1,123 / 0,311
3 / «А»	3/52	2,980* / 0,259
3 / «Б»	3/52	1,546 / 0,626
4 / «А»	3/52	1,902 / 1,182
4 / «Б»	3/52	1,272 / 0,193

* – различия достоверны.

Влияние алкоголя на эффект последовательности. У данной выборки испытуемых, выполнявших задачу в нормальном состоянии, наблюдается ЭП, который наиболее выражен в ответах на сигнал «А» в первых двух сериях. В состоянии алкогольного опьянения этот эффект отсутствует (табл. 4).

Следует отметить, что факт подавления алкоголем эффекта последовательности в известной нам литературе не описан.

Влияние алкоголя на характеристики компонента Р300. Для определения влияния алкоголя на амплитуду Р300 в интервальном окне в 100 мс, заканчивающемся на пике Р300, вычислялась общая средняя мгновенных амплитуд отдельно для лобных и для теменных отведений по схеме: 14 испытуемых / 2 отведения (объединенные лобные и объединенные теменные) / 4 экспериментальные серии. Затем вычислялась нормализованная разница этих средних, полученных по каждому испытуемому в нормальном состоянии и в состоянии алкогольного опьянения для каждой серии по формуле (Ампл. норм. – Ампл. алк.) ×100÷(Ампл. норм. + Ампл. алк.). Во всех случаях для всех испытуемых эта разница была положительной (t=2,009, df=55, p=0,049). То есть во всех случаях алкоголь подавлял амплитуду Р300 (рис. 6).

Сравнение по t-критерию для парных случаев латентных периодов пиков Р300 по отдельности по всем четырем отведениям в четырех экспериментальных сериях показал, что у испытуемых, находившихся в состоянии алкогольного опьянения, по сравнению с трезвыми испытуемыми этот показатель увеличивался (t=2,835, df=279, p=0,005).

Таким образом, алкоголь подавлял амплитуду и увеличивал латентный период пика Р300. Феномен уменьшения амплитуды Р300 нами ожидался, так как был описан многими авторами (Lukas et al., 1990; Grillon et al., 1995; Jääskeläinen et al., 1999). Причем, как это видно на рис. 6, у испытуемых, находящихся в алкогольном состоянии, передний фронт Р300, т.е. переход от пика N200 до пика Р300, является более негативным, чем у этих же испытуемых в нормальном состоянии. Этот феномен в известной нам литературе не описан.

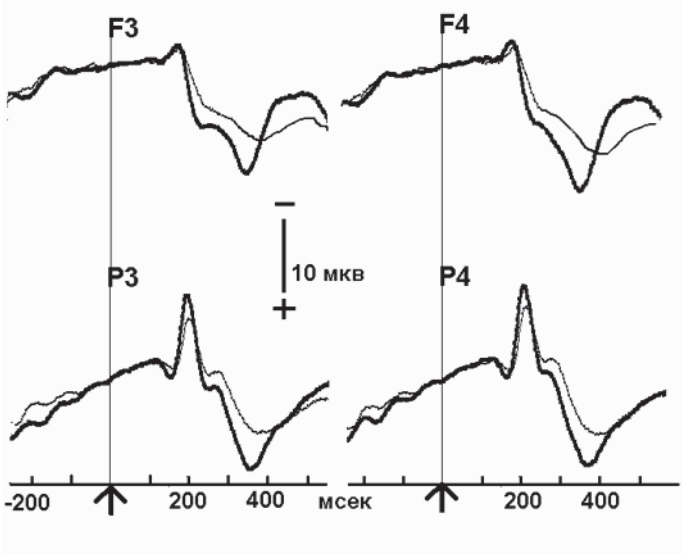


Рис. 6. Влияние эйфорической дозы алкоголя на потенциал Р300, связанный с ответом на сигнал «Б»
Потенциалы усреднены по схеме 4 отведения×4 серии×14 испытуемых. Жирной линией обозначены потенциалы, зарегистрированные у испытуемых в нормальном состоянии. Тонкой линией обозначены потенциалы, зарегистрированные у испытуемых в состоянии алкогольного опьянения. Стрелками обозначены моменты предъявления пускового сигнала

Общий вывод из субъективных отчетов испытуемых, находившихся в алкогольном опьянении, заключается в том, что они не ощущали никаких проблем с ответами, у них не было предпочтений к нажатию той или другой клавиши, как это имело место при выполнении данной задачи в нормальном состоянии.

Таким образом, в проведенных в данной серии экспериментах было показано следующее. 1. Эйфорическая доза алкоголя не действует на скорость отчетных действий, которая имела место до тренировки выполнения задачи выбора. 2. Алкоголь подавляет ЭП, свидетельствующий об использовании информации о только что совершенных действиях для прогнозирования следующих. 3. Под действием алкоголя увеличивается латентный период и уменьшается амплитуда пика Р300, а его передний фронт становится более негативным. 4. Если трезвые испытуемые отмечали, что отвечать на сигнал, который они прогнозировали более точно, легче, чем на другой – менее точно прогнозируемый сигнал, то в состоянии алкогольной эйфории они не ощущали разницы в степени трудности ответов на эти сигналы.

Итак, мы обнаружили, что алкоголь в умеренных дозах не влияет на скорость отчетных действий: время простых ответов, выполняемых испытуемыми в состоянии алкогольного опьянения, не отличается от нормы. Полученные нами данные соответствуют данным, описанным другими авторами. Например, показано, что алкоголь не влияет на время выполнения движений и простых действий (Ritchie, 1980; Jääskeläinen et al., 1999). В других исследованиях показано, что алкоголь не оказывал влияния на распознавание простых сигналов (Huntley, 1974).

Можно предположить, что при отсутствии каких-либо вариантов других действий системы данного отчетного действия не имеют других вариантов связей, поэтому эти связи между системами не меняются настолько, чтобы данное изменение проявилось в скоростных или точностных показателях. Отсутствие Р300 в потенциалах, сопровождающих последовательно выполняемый один и тот же ответ, указывает на отсутствие (во всяком случае, значительное редуцирование) АС в последовательно повторяемом ответе и подтверждают эту мысль. Однако в вероятностной среде нет монотонного появления одного и того же сигнала, требующего одного и того же ответа. На разные сигналы, предъявляемые в случайном порядке, испытуемые должны давать дифференцированные ответы. В данной ситуации в процессе выполнения задачи выбора испытуемые активно применяют различные стратегии, что приводит к совершенствованию выполнения задачи (Конопкин, 1980; Courchesne, 1978; Johnson, 1986).

В процессе многократного выполнения задачи выбора у испытуемых, находящихся в нормальном состоянии, от серии к серии наблюдалось сокращение времени ответа. Причем в рамках эксперимента достоверно более быстрое сокращение времени ответа и уменьшение количества ошибочных ответов происходило на предъявление сигнала «Б» по сравнению с ответами на сигнал «А». Как мы уже отмечали, сигнал «Б» отличался от альтернативного сигнала «А» тем, что в нем интервал между ПрС и ПуС больше на 250 мс. Поэтому, если предъявлялся сигнал «Б», то испытуемые существенно реже ошибались в прогнозировании появления его ПуС, совершали больше точных ответов, чем на сигнал «А» и быстрее совершенствовали ответ на сигнал «Б» – быстрее сокращалось время этого ответа, исчезали ЭП и ошибочные ответы. Испытуемые оценивали ответ на сигнал «Б» как более легкий, чем ответ на сигнал «А». Таким образом, чем эффективнее прогноз определенного сигнала, тем быстрее формируется навык выполнения дифференцированного ответа на этот сигнал. Ответ на менее точно прогнозируемый сигнал «А» совершенствовался по данным показателям медленнее. В Р300, связанном с ответами на сигнал «А», передний фронт имеет достоверно значимый негативный сдвиг по сравнению с Р300, связанным с ответами на сигнал «Б». Сходный по сравнению со здоровыми негативный сдвиг переднего фронта Р300 наблюдался у лиц с психическими расстройствами и был связан с неадекватными действиями (Bruder et al., 2002). Некоторые авторы считают, что на этапе между пиками N200 и Р300 осуществляются мозговые процессы, обеспечивающие принятия решения о движении (Nandrino, Massioui, 1995). Наблюдаемый негативный сдвиг переднего фронта Р300 сопоставим с «волной рассогласования», которая появляется в ответ на неожидаемый сигнал (Наатанен, 1998). По-видимому, передний фронт Р300 отражает смену систем, связанных с прогнозируемым сигналом, на системы, активированные реально предъявленным сигналом. Этот процесс осуществляется во время афферентного синтеза.

У испытуемых, находящихся в состоянии алкогольного опьянения, не наблюдалось совершенствования выполнения задачи выбора – время ответов не сокращалось, испытуемые часто давали ошибочные ответы. Отсутствие эффекта последовательности в их ответах указывает на то, что у них было нарушено прогнозирование,

и во время АС у них значительно чаще, чем в нормальном состоянии, имела место смена набора систем, не соответствующего предъявленному пусковому сигналу, на набор систем, соответствующий этому сигналу. Если мы сопоставим рис. 4 и 6, то мы увидим сходный феномен. Так, на рис. 6 показано, что в Р300, связанном с ответом на сигнал «А», который прогнозируется правильно, с более низкой вероятностью по сравнению с прогнозированием сигнала «Б», имеет место негативный сдвиг переднего фронта Р300. Негативный сдвиг переднего фронта Р300 на один и тот же сигнал «Б» у испытуемых в состоянии алкогольного опьянения по сравнению с трезвыми испытуемыми можно трактовать как снижение способности к прогнозированию у лиц в алкогольном опьянении. Прогноз осуществляется на основании учета предшествующих действий или раздражителей, что проявляется в эффекте последовательности. Его у лиц в алкогольном состоянии мы не выявили. Вывод о том, что алкоголь подавляет прогнозирование, был сделан и другими авторами на основании результатов исследования саккадических движений глаз в направлении прогнозируемых и непрогнозируемых зрительных мишеней (Wegner, Fahle, 1999). Оказалось, что алкоголь задерживает саккадические движения глаз в сторону прогнозируемой мишени и не изменяет латентного периода начала этих движений в сторону непрогнозированных мишеней. Как мы уже отмечали, во время АС системы объединяются друг с другом, причем от одного действия к другому в эти связи вступают неодинаковые наборы, на что указывает эффект последовательности (ЭП). Такой перебор взаимодействующих систем от ответа к ответу, по-видимому, приводит к формированию некоторого совершенного набора систем, который обеспечивает эффективные действия – сокращается время ответа, исчезает ЭП и ошибочные действия. Алкоголь, нарушая межсистемные взаимодействия, по-видимому, блокирует возможность включать в каждое действие новые наборы систем и тем самым препятствует совершенствованию навыка. Предполагаемый механизм заключается в том, что в ответ на введение алкоголя в мозге формируются гомеостатические механизмы, защищающие нейроны от токсического действия алкоголя, в частности, за счет блокирования синаптических входов (Davis, Bezprozvanny, 2001; McGough et al., 2004). Блокирование синаптической активности нейронов, в свою очередь, приводит к невозможности устанавливать новые эффективные связи между нейронами разных систем в процессе афферентного синтеза. По-видимому, у субъекта, находящегося в нормальном состоянии, перестройки межсистемных связей и формирование новых наборов систем для обеспечения действия переживаются субъективно как легкое или трудное действие, что может способствовать выбору наиболее эффективных наборов систем. При действии алкоголя этого чувства нет, поскольку нового выбора систем для обеспечения действия не происходит.

Следовательно, у испытуемых в состоянии алкогольного опьянения в процессе выполнения задачи сенсомоторного выбора не происходило изменений в межсистемных отношениях. Мы объясняем это тем, что при острой алкоголизации активируется гомеостатическая защита функциональных систем, которая фиксирует исходные синаптические связи между нейронами определенных систем и блокирует возможность модификации этих связей в процессе афферентного синтеза, во время которого формируется набор систем, обеспечивающих отчетное действие.

4. Влияние острого введения алкоголя на предвидение и формирование пространственной памяти в виртуальной среде

На следующем этапе, основываясь, в частности, на описанных выше результатах, мы развернули исследования, реализация которых направлена на сопоставление острых эффектов алкоголя на гиппокамп-зависимые и гиппокамп-независимые когнитивные процессы у людей, решающих пространственные (как считается, гиппокамп-зависимые) и непространственные (гиппокамп-независимые) задачи, моделируемые в компьютерных тестах с виртуальной навигацией в лабиринтах.

Считается, что гиппокамп выполняет важную роль в создании и сохранении пространственно-когнитивных карт (O'Keefe, Nadel, 1978; Moscovitch et al., 2006). Например, у крыс и голубей при повреждении гиппокампа нарушалась пространственная навигация (Bingman, 1988; Morris et al., 1982). В этологических исследованиях показано, что у птиц (Krebs et al., 1989) и грызунов (Jacobs et al., 1990) размеры гиппокампа значительно больше у тех видов, чье поведение особенно связано со способностью ориентироваться в пространстве. Однако основные исследования гиппокампально-зависимой памяти проводились на грызунах, выполняющих пищевое или оборонительное поведение в тех или иных лабиринтах (McNaughton et al., 2006).

Упомянутые и другие многочисленные данные необходимо было сопоставить с результатами, полученными на человеке. Такая возможность появилась с развитием новых компьютерных технологий. Были созданы виртуальные лабиринты для тестирования различных форм памяти у человека (Etchamendy, Bohbot, 2007; Livingston, Skelton, 2007), и оказалось, что некоторые показатели поведения человека в этих лабиринтах сходны с показателями поведения крыс в реальных лабиринтах (Astur et al., 2004). Стало возможно изучать у человека пространственную память в таких же моделях, как у грызунов. Кроме того, виртуальные лабиринты имеют множество преимуществ над традиционными методами исследования пространственной памяти в плане гибкости, генерализации и экспериментального контроля (Astur et al., 2004). Новизна данного этапа работы заключалась в том, что мы могли сопоставить результаты «прохождения» лабиринта субъектом в нормальном состоянии и в ситуации алкогольного опьянения, когда алкоголь подавляет активность гиппокампа, и сравнить их с результатами прохождения лабиринта грызунами с поврежденным гиппокампом или при остром введении им алкоголя (Alexandrov et al., 1993, 2013; Ludvig et al., 1995; Matthews et al., 1999).

Для дифференцированной оценки функций памяти человека, зависящей от гиппокампа, и оценки влияния алкоголя на них была разработана система компьютерных тестов с навигацией испытуемого в виртуальной среде. Система состоит из трех основных модулей – задания протокола тестирования, теста с виртуальной средой и модуля визуализации траектории движения с сохранением результатов тестирования для последующего анализа. В системе доступны 3 вида виртуальных лабиринтов – водный лабиринт Морриса, сухопутный лабиринт Барнс и 8-рукавный радиальный лабиринт. Система разработана на платформе Java, что позволяет разместить тесты на сайте в интернете для свободного доступа.

Нами была создана методика тестирования и осуществлено экспериментальное исследование: набор нормативного материала по обучению навигации в водном лабиринте Морриса. В экспериментах участвовали 29 добровольцев (9 мужского и 20 женского пола, средний возраст – 23 года), правши, с нормальным или с корректированным зрением. Испытуемым сообщали, что они будут находиться в виртуальном бассейне и их задача заключается в том, чтобы при «плавании» как можно быстрее найти скрытую под водой платформу и выбраться на нее. Испытуемые проходили тестирование в нормальном состоянии и состоянии алкогольного опьянения с интервалом 2–3 месяца. Процедурно, испытуемые начинали «плыть» из одной из четырех стартовых позиций (север, запад, юг, восток): по пять раз в случайном порядке с каждой позиции. Интервал между стартами составлял 5 с. Когда испытуемый «проплывал» над платформой, платформа слегка поднималась. После этого испытуемый мог «плавать» около платформы еще 3 с, и сеанс заканчивался. В работе анализировали общее время, необходимое для нахождения платформы, время остановок для смены направления «плавания», тактику «плавания», а также ЭП, т.е. влияние характеристик предшествующего старта на последующий.

В первых пробах испытуемые применяли такие стратегии движений по лабиринту, как «зигзаг», «круг», «зигзаг и круг». Но в процессе тренировки время прохождения по лабиринту сокращалось и они переходили к стратегии «проход по ориентирам» или «прямой проход» (рис. 7).

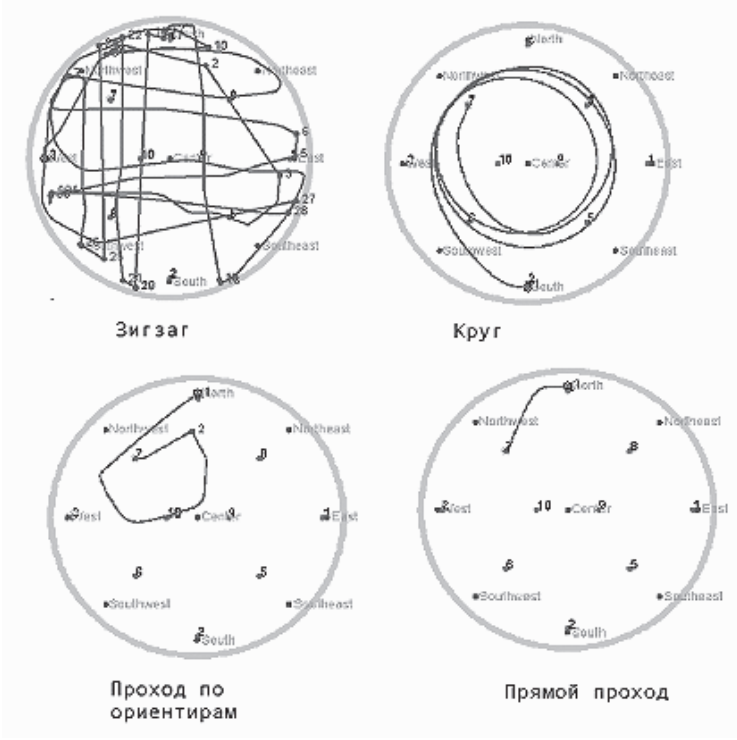


Рис. 7. Варианты стратегий для достижения платформы в водном лабиринте Морриса (испытуемый в нормальном состоянии)

При оценке поведения испытуемых (рис. 8, 9) было установлено, что:

1) испытуемые оценивали в качестве критического показателя время с момента старта до нахождения платформы. Поэтому после каждого старта они пытались найти наиболее экономную стратегию, что часто приводило к разнообразию стратегий от старта к старту;

2) у каждого испытуемого могла появиться «неординарная» стратегия, но у большинства из них выявлялась определенная устойчивая стратегия: прямой путь к вероятной платформе при ориентировке на какие-то признаки среды, круговые движения по периметру бассейна с уменьшением диаметра каждого очередного круга, зигзагообразные движения от одного края до противоположного;



Рис. 8. Процент времени нахождения трезвого испытуемого в квадранте лабиринта, где находится платформа (количество проб условно разделено на четыре последовательные серии)

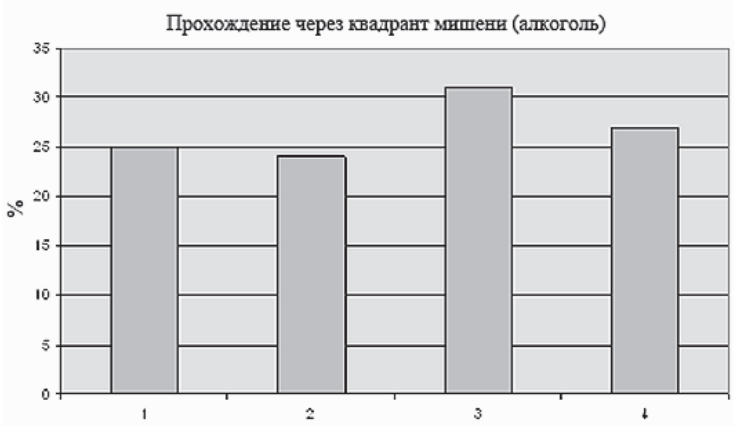


Рис. 9. Процент времени нахождения в квадранте лабиринта, где находится платформа, испытуемого в состоянии алкогольного опьянения (количество проб условно разделено на четыре последовательные серии)

3) в повторных стартах из одного и того же места наблюдался ЭП, т.е. зависимость последующей стратегии от предшествующей;

4) в состоянии алкогольного опьянения усовершенствование навыка затруднялось. В большинстве проб результаты не достигались и не отмечался выход на такие стратегии движения, как «проход по ориентирам» или «прямой проход». По-видимому испытуемые в состоянии алкогольного опьянения не учитывали в последующих пробах опыт поведения в предшествующих пробах.

Проверка и дальнейшая разработка предложенного нами метода оценки клинического нарушения гиппокамп-зависимых состояний производилась путем выявления закономерностей острого влияния этанола на *динамику* гиппокамп-зависимого пространственного обучения. Мы выявляли ЭП при формировании навыка ориентирования в виртуальном лабиринте Морриса. Сравнивали динамику обучения ориентированию в этом лабиринте под действием острого введения этанола и в контроле при использовании анализа ЭП в качестве инструмента данного сравнения. Система компьютерных тестов с навигацией испытуемого в виртуальной среде состояла из трех модулей – задания протокола тестирования, теста с виртуальной средой и модуля визуализации траектории движения с сохранением результатов тестирования на диск для последующего анализа. В лабиринте Морриса испытуемый перемещается по виртуальному бассейну в поисках скрытой под водой платформой (цели). При составлении протокола тестирования определялись: точка начала испытания в среде, месторасположение цели в лабиринте, время испытания и т.д. В протоколе тестирования указывалось количество проб (20), причем каждая проба начиналась с одной из двух выбранных в случайном порядке позиций в лабиринте. Время каждой пробы ограничено 30 секундами. Если в течение этого времени испытуемый не достигал цели, то проба считалась ошибочной. На вертикальных поверхностях лабиринта были размещены визуальные ориентиры в виде картин-изображений, которые могли быть использованы испытуемыми для пространственной ориентации. Для анализа траекторий движений использовалась программа Win Track, применяемая для обсчета траекторий пространственной ориентации в экспериментах с видеотрекингом у животных, а также программа Segment Analyser, специально разработанная для выделения и анализа структуры поведенческих актов. Исследования были проведены на выборке из 20 добровольцев обоего пола в возрасте от 21 до 35 лет, имеющих опыт бытового употребления алкоголя, но не имеющие алкогольной зависимости. Испытуемые совершали поиск скрытой платформы в виртуальном лабиринте Морриса. Они начинали движение по лабиринту с одной из двух возможных стартовых позиций – 1 или 2, которые предъявлялись в случайном порядке и равновероятно (рис. 10). Всего они совершали 20 проб. На каждом испытуемом прохождение водного лабиринта Морриса проводилось дважды – в контрольном состоянии и в состоянии алкогольного опьянения – с интервалом 1–2 месяца. Очередность этих экспериментов для каждого испытуемого была случайной. В эксперименте испытуемые выполняли пространственные задачи, направленные на тестирование предположительно гиппокамп-зависимых когнитивных процессов. Испытуемые принимали либо 20-процентный раствор этанола из расчета 1 мл 96-процентного этанола на 1 кг веса, либо воду

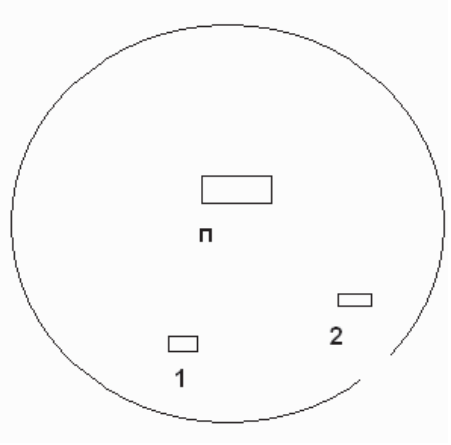


Рис. 10. Схема стартовых позиций 1 и 2

в таком же количестве в контрольных экспериментах. Именно такая доза алкоголя, как нами было показано ранее, производила эффекты блокирования активности нейронов, принадлежащих к наиболее дифференцированным системам как у людей, так и у разных животных (Alexandrov et al., 1991, 1993, 1997, 1998, 2000, 2001, 2009, 2013). Концентрация алкоголя в выдыхаемом воздухе определялась с помощью алкометра (RK-1100, Япония). При обработке результатов оценивалось время достижения цели, количество правильных и ошибочных действий, количество остановок и поворотов при прохождении лабиринта, время нахождения в зоне цели. ЭП, характеризующий процесс приобретения навыка, оценивался по зависимости времени прохождения лабиринта от предшествующих прохождений из 2 предшествующих позиций старта: 1,1; 1,2; 2,1; 2,2 (см. рис. 10).

Данные показатели сравнивались при выполнении задач в нормальном состоянии и в состоянии алкогольного опьянения. Обнаружено, что время поиска скрытого лабиринта у испытуемых в трезвом состоянии и в состоянии алкогольного опьянения составляло 34,2 с и 48,5 с, соответственно (различия достоверны; t=4,8; p=0,023). В процессе многократного повторения поиска платформы у «контрольных» испытуемых время поиска достоверно сократилось (t=-5,3; p=0,015), а у испытуемых «алкогольной» группы это время не изменилось (t=-0,12; p=0,930). Для анализа ЭП сопоставлялись (ANOVA) различия во времени поиска скрытой платформы с позиций 1 или 2 в контрольном состоянии и в состоянии опьянения. Сравнивали зависимость этого времени от комбинации предшествующих 2 проб, начинающихся с соответствующих стартовых позиций: 1,1; 1,2; 2,1; 2,2. Время поиска платформы со стартовой позиции 1 и 2 у «контрольных» испытуемых зависело от последовательности предшествующих проб (df 1/20, F=3,199, p=0,020 и df 2/20, F=3,163, p= 0,013). Время поиска платформы со стартовой позиции 1 и 2 у испытуемых в состоянии алкогольного опьянения не зависело от последовательности предшествующих проб (df 3/19, F=0,336, p=0,84 и df 4/19, F=0,311, p=0,63). Различия недостоверны. ЭП многие авторы связывают с прогнозированием ситуации (у нас – стартовой позиции), в связи с

которой будет осуществляться соответствующее поведение. В связи с этим мы предполагаем, что эти данные свидетельствуют в пользу высказанного выше предположения о том, что алкоголь подавляет процесс прогнозирования, который, по-видимому, играет важную роль в приобретении нового навыка.

Результаты экспериментов показывают, что сокращению времени поиска у «контрольной» группы сопутствовал ЭП, а у «алкогольной» группы такого сокращения не наблюдалось и ЭП не выявлялся. Соответствие более эффективного обучения в трезвом состоянии и возникновения в этом случае ЭП, по-видимому, не случайно. Можно предположить, что алкоголь существенно подавляет процесс прогнозирования, который тесно связан с учетом оценки результатов предшествующих действий при планировании следующих действий. Оценка достигнутых результатов, сопоставление запланированного и реально полученного, как предполагается, модифицирует память. Подавление данного процесса оказывается важным фактором, влияющим на динамику формирования памяти.

5. Заключение

Полученные нами данные и их анализ позволяют полагать, что они находятся в соответствии с целями разработки метода оценки клинического нарушения гиппокамп-зависимой памяти и проверки предположения о возможных нарушениях планирования будущего при обучении, а следовательно и самого процесса обучения при острой алкогольной интоксикации.

Литература

Александров Ю.И. Системная организация и реорганизация поведения // Пятнадцатые сеченовские чтения. НИИ нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАМН. 2009. С. 23-61.

Александров Ю.И. Закономерности актуализации индивидуального опыта и реорганизации его системной структуры: комплексное исследование // Труды ИСА РАН. 2011. Т. 61. Вып. 3. С. 3-25.

Александров Ю.И. Психофизиологические закономерности научения и методы обучения // Психол. журнал. 2012. Т. 33. № 6. С. 5-19.

Анохин П.К. Избранные труды. Философские аспекты теории функциональных систем теории функциональных систем. М.: Наука, 1978.

Безденежных Б.Н. Динамика взаимодействия функциональных систем. М.: Институт психологии РАН, 2004.

Бодунов М.В., Безденежных Б.Н., Александров Ю.И. Изменения шкальных оценок тестовых психодиагностических методик при воздействии алкоголя // Психол. журнал. 1997. Т. 18. № 5. С. 95-101.

Конопкин О.А. Психологические механизмы регуляции деятельности. М.: Наука, 1980.

Наатанен Р. Внимание и функции мозга. М.: МГУ, 1998.

Найсер У. Познание и реальность. М.: Прогресс, 1981.

Пономарев Я.А. Психологическое и физиологическое в системе комплексного исследования // Системный подход к психофизиологической проблеме. М.: Наука, 1982. С. 5-+10.

Скотникова И.Г. Зрительное различение и рефлективность–импульсивность // Психол. журнал. 1999. Т. 20. № 1. С. 32-41.

Швырков В.Б. Системно-волюционный подход к изучению мозга, психики и сознания // Психол. журнал. 1988. Т. 9. № 4. С. 132-148.

Alexandrov L.I., *Alexandrov Yu.I.* Changes of auditory-evoked potentials in response to behaviorally meaningful tones induced by acute ethanol intake in altritial nestlings at the stage of formation of natural behavior // Alcohol. 1993. Vol. 10. P. 213-217

Alexandrov Yu.I., Grinchenko Yu.V., Jarvilehto T. et al. Acute effect of ethanol on the pattern of behavioral specialization of neurons in the limbic cortex of the freely moving rabbit// Acta Physiol. Scand. 1990. Vol. 140. P. 257-268.

Alexandrov Yu.I., Grinchenko Yu.V., Laukka S. et al. Acute effects of alcohol on unit activity in the motor cortex of freely moving rabbits: comparison with the limbic cortex // Acta Physiol. Scand. 1991. Vol. 142. № 3. P. 429-435.

Alexandrov Yu.I., Grinchenko Yu. V., Laukka S. et al. Effect of ethanol on hippocampal neurons depends on their behavioral specialization // Acta Physiol. Scand. 1993. Vol. 149. P. 105-115.

Alexandrov Yu.I., .Grechenko N., Gavrilov V.V. et al. Formation and realization of individual experience // J. Higher Nerv. Activity, 1997. Vol. 47. № 2. P. 34-45.

Alexandrov Yu.I., Sams M., Lavikainen J. et al. Differential effects of alcohol on the cortical processing of foreign and native language // Int. J. Psychophysiology. 1998. Vol. 28. P. 1-10.

Alexandrov Yu.I., Grinchenko Yu.V., Bodunov M.V. et al. Neuronal subserving of behevior before and after chronic ethanol treatment // Alcohol. 2000. Vol. 22. P. 97-106.

Alexandrov Yu.I., Grinchenko Yu.V., Shevchenko D.G., Averkin R.G., Matz V.N., Laukka S., Korpusova A.V. A subset of cingulate cortical neurons is specifically activated during alcohol-acquisition behaviour // Acta Physiol. Scand. 2001. Vol. 171. P. 87-97.

Alexandrov Y.I., Sams M.E. Emotion and consciousness: Ends of a continuum // Psychology in Russia. State of the Art. Sci. Yearbook.M., 2009. Vol. 2. P. 141-186.

Alexandrov Yu.I., Grinchenko Yu.V, Shevchenko D.G. et al. The effect of ethanol on the neuronal subserving of behavior in the hippocampus // J. Behav. Brain Science. 2013. Vol. 3. P. 107-130.

Astur R.S., Tropp J., Sava S. et al. Sex differences and correlations in a virtual Morris water task, a virtual radial arm maze, and mental rotation // Behav. Brain Res. 2004. Vol. 151. P. 103–115.

Averbeck B.B., Chafee M.V., Crowe D.A. et al. Parallel processing of serial movements in prefrontal cortex // PNAS. 2002. Vol. 99. P. 13172-13177.

Bertelson P., *Tisseyre F.* Choice reaction time as a function of stimulus versus response relative frequency of occurrence // Nature. 1966. Vol. 212. P. 1069-1070.

Bingman V. Unimpaired acquisition of spatial reference memory, but impaired homing performance in hippocampal ablated pigeons // Behav. Brain Res. 1988. Vol. 27. P. 179-188.

Bruder G.E., Kayser J., Tenke C.E., et al. Cognitive ERPs in depressive and anxiety disorders during tonal and phonetic oddball tasks // Clinical Electroencephalography. 2002. Vol. 33. P. 119-124.

Coles M.G.H., *Gratton G., Donchin E.* Detecting early communication: using measures of movement – related potentials to illuminate human information processing // Biolog. Psychology. 1988. Vol. 26. № 1/2/3/ (special issue). P. 69-89.

Courchesne E. Changes in P3 waves with event repetition: long-term effects on scalp distributions and amplitude // EEG and Clinical Neurophysiology. 1978. Vol. 45. P. 754-766.

Davis G.W., *Bezprozvanny I.* Maintaining the stability of neural function: a homeostatic hypothesis // Ann. Rev. Physiology. 2001. Vol. 63. P. 847-869.

Desmurget M., Pelisson D., Rossetti Y. et al. From eye to hand: planning goal-directed movements // Neurosci. Biobehav. Rev. 1998. Vol. 22. P. 761-788.

Donchin E., Coles M.G.H. Is the P300 component manifestation of context updating? // Behav. Brain Sci. 1988. Vol. 11. P. 357-374.

Etchamendy N., *Bohbot V.D.* Spontaneous navigational strategies and performance in the virtual town // Hippocampus. 2007. Vol. 17. P. 595-599.

Geisler M.W., Polich J. P300 and time of day: Circadian rhythms, food intake, and body temperature // Biological Psychology. 1990. Vol. 31. P. 117-136.

Grillon C., Sinha R., O`Malley S. Effect of ethanol on the processing of low probability stimuli: an ERP study // Psychopharmacology. 1995. Vol. 119. P. 455-465.

Huntley M.S. Jr. Effects of alcohol, uncertainty and novelty upon response selection // Psychopharmacologia. 1974. Vol. 39. P. 259-266.

Jacobs L.F., Gaulin S.J.C., Sherry D.F. et al. Evolution of spatial cognition: sex-specific patterns of spatial behavior predict hippocampal size // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990. Vol. 87. P. 6349-6352.

Johnson R., Jr. A triarchic model of P 300 amplitude // Psychophysiology. 1986. Vol. 23. P. 367-384.

Jääskeläinen I.P., Schröger E., Näätänen R. Electrophysiological indices of acute effects of ethanol on involuntary attention shifting // Psychopharmacology. 1999. Vol. 141. P. 6-21.
Krebs J.R., Sherry D.F., Healy S.D. et al. Hippocampal specialization of food-storing birds // Proc. Natl. Acad. Sci. 1989. Vol. 6. P. 1388-1392.
LaBerge D., Tweedy J.R. Presentation probability and choice time // J. Experimental Psychology. 1964. Vol. 68. P. 477.
Livingstone S.A., *Skelton R.W.* Virtual environment navigation tasks and the assessment of cognitive deficits in individuals with brain injury // Behav. Brain Res. 2007. Vol. 185. P. 21-31.
Laukka, S.J., *Jarvilehto T., Alexandrov, Yu.I. et al.* Influence of alcohol on human frontal midline theta activity and task execution // Dev. Brain Dysfunct. 1997. Vol. 10. P. 128-132.
Ludvig N., *Altura, B.T., Fox, S.E. et al.*The suppressant effect of ethanol, delivered via intrahippocampal microdialysis, on the firing of local pyramidal cells in freely behaving rats // Alcohol. 1995. Vol. 12. P. 417- 421.
Lukas, S.E., Mendelson J.H., Kouri E. et al. Ethanol-induced alterations in EEG alpha activity and apparent source of the auditory P300 evoked response potential // Alcohol. 1990. Vol. 7. P. 471-477.
Matthews D.B., *Silvers J.R.* The use of acute ethanol administration as a tool to investigate multiple memory systems // Neurobiology of Learning and Memory. 2004. Vol. 82. P. 299-308.
Matthews D., *Ilgen M., White A. et al.* Acute ethanol administration impairs spatial performance while facilitating nonspatial performance in rats // Neurobiology of Learning and Memory. 1999. Vol. 72. P. 169-179.
McGough N.N.H., *He D-Y, Logrip M.L. et al.* RACK1 and Brain-Derived Neurotrophic Factor: A Homeostatic Pathway That Regulates Alcohol Addiction // J. Neurosci. 2004. Vol. 24. P. 10542–10552.
McNaughton B.L., *Battaglia F.P., Jensen O. et al.* Path integration and the neural basis of the 'cognitive map // Nat. Rev. Neurosci. 2006. Vol. 7. P. 663-678.
Mecklinger A., *Ullsperger P., Molle M. et al.* Event-related potentials indicate information extraction in a comparative judgment task // Psychophysiology. 1994. Vol. 31. P. 23-28.
Moscovitch M., *Nadel L., Winocur G. et al.* The cognitive neuroscience of remote episodic, semantic and spatial memory // Curr. Opin. Neurobiol. 2006. Vol. 16. P. 179-190.
Morris R.G.M., Garrud P., Rawlins J.P., O'Keefe J. Place navigation in rats with hippocampal lesions // Nature. 1982. Vol. 297. P. 681-3.
Munson R., Ruchkin D.S., Ritter W. et al. The relation of P-3b to prior and future behavior // Biological Psychology. 1984. Vol. 19. P. 1-29.
Nandrino J.L., *Massioui F.E.* Temporal localization of the response selection processing stage // Int. J. Psychophysiology. 1995. Vol. 19. P. 257-261.
O'Keefe J.A., *Nadel L.* The Hippocampus as a cognitive map. Oxford: Clarendon Press, 1978.
Palmer B., Nasman V.T., Wilson, G.F. Task decision difficulty: Effects on ERPs in a same-different letter classification task // Biological Psychology. 1994. Vol. 38. P. 199-214.
Polich J., Bloom F.E. P300, alcoholism heritability, and stimulus modality // Alcohol. 1999. Vol. 17. P. 149-156.
Riehle A., *Grün S., Diesmann M. et al.* Spike synchronization and rate modulation differentially involved in motor cortical function // Science. 1997. Vol. 278. P. 1950-1953.
Ritchie J.M. The aliphatic alcohols // The pharmacological basis of therapeutics. Ed. A.G. Gilman. NY: MacMillan, 1980. (Цит. по Grillon et al., 1995)
Squire L.R., *Alvarez P.* Retrograde amnesia and memory consolidation: a neurobiological perspective // Curr. Opin. Neurobiology. 1995. Vol. 5. P. 169-177.
Tolman E.C. Cognitive maps in rats and men // Psychol. Rev. 1948. Vol. 55. P. 189-208.
Tzambazis K., *Stough C.* Alcohol impairs speed of information processing and simple and choice reaction time and differentially impairs higher-order cognitive abilities // Alcohol & Alcoholism. 2000. Vol. 35. P. 197-201.
Ullsperger P., Metz A., Gille H. The p300 component of event-related brain potential and mental effort // Ergonomics, 1988. Vol. 31. P. 1127-1137.
Verleger R. Sequential effects on response times in reading and naming colored color words // Acta Psychologica. 1991. Vol. 77. P. 167-189.
Wegner A.-J., *Fahle M.* Alcohol and visually guided saccades: gap effect and predictability of target location // Psychopharmacology. 1999. Vol. 146. P. 24-32.
Woodward S.H., *Brown W.S., Marsh J.T., Dawson M.E.* Probing the time-course of the auditory oddball P3 with secondary reaction time // Psychophysiology. 1991. Vol. 28. P. 609-618.

Технология оптической интраоперационной диагностики в нейроонкологии на основе спектроскопического анализа нервных тканей

Т.А. Савельева, В.Б. Лощенов, А.В. Рябова, М.В. Лощенов, П.В. Грачев, М.А. Исаев, Д.В. Поминова, В.В. Волков, С.А. Горяйнов, П.В. Зеленков, Г.М. Юсубалиева, Г.В. Павлова, А.А. Потапов

Содержание

1. Текущее состояние оптической навигации в нейроонкологии
2. Маркеры опухолевых изменений в нервных тканях, доступные для анализа методами оптической спектроскопии
3. Методы интраоперационной спектроскопической навигации
4. Флуоресцентный анализ в нейроонкологии
   4.1. Анализ кинетики накопления 5-АЛК-индуцированного Пп IX в аутоидентичных клеточных культурах
   4.2. Метод одновременного спектроскопического анализа эндогенных флуорофоров и 5-АЛК-индуцированного протопорфирина IX, содержащихся в нервных тканях
5. Комбинированный спектроскопический анализ нервных тканей по спектрам флуоресценции и диффузного отражения *in vivo*
   5.1. Зависимость рассеивающих свойств нервных тканей и накопления ими 5-АЛК-индуцированного протопорфирина IX от степени их малигнизации
   5.2. Комбинированный спектроскопический метод определения границ опухоли в нейроонкологии
6. Перспективы развития методов оптической спектроскопии в нейроонкологии
   6.1. Развитие метода комбинированной спектроскопии с использованием различных типов оптоволоконных зондов
   6.2. Анализ спектрально разрешенных изображений в нейроонкологии
   6.3. Новые флуоресцентные маркеры и фотосенсибилизаторы для целей нейроонкологии

1. Текущее состояние оптической навигации в нейроонкологии

В современной клинической практике в лечении внутричерепных опухолей наиболее важными являются точная диагностика локализации и границ опухоли и, как следствие – обеспечение максимальной органосохранности при хирургическом удалении новообразования (Lacroix et al. 2001). Ввиду различий в морфологии внутричерепных опухолей эффективным решением повышения чувствительности

Сокращения: ГК – главный компанент; НАДН – никотинамидадениндинуклеотид; Пп IX – 5-АЛК-индуцированный протопорфирин; ФАД – флавинадениндинуклеотид; 5-АЛК – 5-аминолевулиновая кислота.

и специфичности интраоперационной диагностики является одновременный мониторинг нескольких параметров, характерных для опухолевой ткани.

В настоящий момент в клинике активно используется метод флуоресцентной видеонавигации (http://www.karlstorz.com/cps/rde/xchg/SID-25771F55-1AFCF565/karl-storz-en/hs.xsl/8405.htmn.d.); (http://www.surgicalmicroscopes.com/product/zeiss-pentero-microscopen.d.), основанный на регистрации флуоресценции 5-АЛК-индуцированного протопорфирина IX (Пп IX), накапливающегося в быстро пролиферирующих клетках опухоли за счет метаболических нарушений. Однако степень накопления Пп IX в опухоли зависит как от скорости пролиферации, так и от нарушения гематоэнцефалического барьера и степени развития некроза, и следовательно, определение концентрации и локализации 5-АЛК индуцированного Пп IX не может являться однозначным критерием для диагностики опухоли. Таким образом, для получения более полной информации о состоянии исследуемых тканей может быть дополнительно использован анализ кровенаполненности нервных тканей и степени насыщения гемоглобина кислородом, а также анализ содержания эндогенных флуорофоров, таких как никотинамидадениндинуклеотид (НАДН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД), позволяющих оценить метаболические и митохондриальные нарушения, происходящие в ткани при возникновении и развитии опухоли (Heikal, 2010). Методы оптической спектроскопии могут обеспечить одновременный анализ указанных параметров с высокой точностью, в режиме реального времени (Lin et al., 2011; Valdés et al., 2011).

2. Маркеры опухолевых изменений в нервных тканях, доступные для анализа методами оптической спектроскопии

Как показали исследования (Stummer et al., 2008; Roberts et al., 2011), содержание Пп IX в глиальных опухолях головного мозга является высокоспецифичным критерием для демаркации границ опухоли, а также определения степени ее озлокачествления (Gibbs-Strauss et al., 009). Пп IX обладает также фотосенсибилизирующими свойствами, приводящими к генерации реактивных форм кислорода при поглощении излучения с характерной длиной волны, что позволяет его использовать как для интраоперационной навигации, так и для проведения фотодинамической терапии.

Пп IX характеризуется достаточно высоким квантовым выходом флуоресценции, что в сочетании с его свойством селективно накапливаться в клетках, характеризующихся ускоренным делением, обуславливает популярность его использования в качестве опухолевого маркера. При этом спектр поглощения Пп IX достаточно широк, чтобы можно было использовать почти любой диапазон видимого спектра для возбуждения его флуоресценции.

Однако в 30% случаев наблюдается лишь незначительное накопление препарата в опухолевых клетках (Potapov et al., 2011), что обусловлено рядом факторов, таких как уровень глюкозы, насыщение тканей кислородом, уровень кислотности, стадия клеточного цикла (Pogue et al., 2010). Также в исследовании (Valdéés et al., 2011a,b)

было показано, что значительное число образцов ткани (около 40%), содержавшее 5-АЛК-индуцированный протопорфирин IX в концентрации не ниже 0,1 мг/мл, не визуализировалось с помощью используемого для интраоперационной навигации видеофлуоресцентного микроскопа.

В связи с вышеперечисленными факторами, затрудняющими интраоперационную навигацию с использованием 5-АЛК-индуцированного протопорфирина IX, необходимы дополнительные критерии для интраоперационной диагностики исследуемых тканей. Одним из наиболее широко используемых прогностических критериев при определении степени озлокачествления опухоли является изменение сосудистой структуры и, как следствие, – кровенаполнение опухоли, определяемое, как правило, посредством предоперационной МРТ. Эти же параметры могут быть определены интраоперационно средствами спектроскопии диффузного отражения, что позволяет распространить выводы, основанные на результатах анализа данных предоперационной МРТ-диагностики, на результаты спектрального анализа *in vivo*. Кровенаполнение коррелирует с уровнем васкуляризации и степенью злокачественности глиом (Takano et al., 1996; Takahashi et al., 1992), плотность микрососудов в глиоме может быть независимым прогностическим фактором (Scatliff et al., 1969; Weidner, 1998); гипоксия также коррелирует со степенью малигнизации опухоли (Evans et al., 2004).

При рассмотрении структурных изменений, происходящих в нервных тканях с развитием глиальных опухолей, необходимо учитывать тот факт, что их основной характеристикой является рост вдоль миелинизированных нервных волокон и кровеносных сосудов без формирования капсулы, что приводит к инфильтрации нормального белого вещества головного мозга опухолевыми клетками (Brat, 2004). На органо-тканевом уровне организации глиальные опухоли состоят из центральной и перифокальной зон (Giese et al., 2003; Tonn, Goldbrunner, 2003) и приводят в процессе развития к смещению, отклонению и разрушению нервных трактов. Центральная зона мультиформной глиобластомы (наиболее злокачественная форма глиальных опухолей) характеризуется развитием некроза в ядре опухоли с сопутствующими деструктивными изменениями миелинизированных нервных волокон (Brunberg et al., 1995; Sinha et al., 2002). Опухоли без некроза в центре и отека в перифокальной зоне, такие как доброкачественные глиомы (стадии I-II по классификации ВОЗ) или анапластическая астроцитома (стадия III), как правило, имеют более однородную структуру по всему объему.

На масштабном уровне тканевой организации следует также учитывать количество и форму клеточных мембран. Как известно, около 50% белого вещества составляют миелиновые оболочки нервных трактов, представляющие собой многослойные мембраны, состоящие из липидного бислоя (70–85% сухого вещества) с протеиновыми включениями (15–30%) (Johansen-Berg, Behrens, 2009; Brady et al., 2011), что обуславливает высокий показатель преломления этой структуры. Также имеет значение то, насколько развита поверхность мембран астроцитов, поскольку этот фактор изменяется при уплотнении клеток в опухоли и также влияет на рассеяние. Значительный спад индекса фракционной анизотропии в центре глиобластомы обусловлен высокой степенью дезинтеграции нервных волокон и некротичес-

кими изменениями, в то время как его более умеренные отклонения наблюдаются в перифокальной зоне, где нервные тракты еще структурированы и наблюдаются интактные клетки глии (LeBihan et al., 2001).

На клеточном уровне мультиформная глиобластома (стадия IV) проявляет такие свойства, как плотноклеточность, атипическое развитие ядер, рост их размеров и плеоморфизм (разнообразие форм) (Candolfi et al., 2007). Анапластическая астроцитома, располагающаяся в системе классификации ближе к категории злокачественных, характеризуется повышением клеточной плотности, анаплазией и митозами, однако в меньшей степени, чем глиобластома. Доброкачественные опухоли проявляют умеренное повышение плотности клеток и увеличение размера ядер без проявления клеточной атипии и митотической активности (Schiffer, 2006; Sarkar et al., 2009).

На субклеточном уровне наиболее критические изменения происходят с содержанием и структурой митохондрий. В нормальной ткани митохондрии составляют порядка 7–8% от объема клетки (Pysh, Khan, 1972; Beauvoit et al., 1995). Было показано, что в ткани печени митохондрии оказывают существенное влияние на рассеяние света клеткой (Beauvoit et al., 1994; Beauvoit, Chance, 1998). Работы посвященные структурному анализу митохондрий в клетках астроцитарных опухолей посредством электронной микроскопии (Gabriel, 2011; Oudard et al., 1997), показали высокую гетерогенность их расположения в клетке, частичное или полное разрушение крист и уменьшение числа митохондрий.

Кроме того, диагностику состояния тканей, а именно – выявление мультиформной глиобластомы, наиболее часто встречающейся (до 52% первичных опухолей мозга и до 20% всех внутричерепных опухолей) опухоли мозга (Смирнова и др., 2004; Борисов, Сакаева, 2011), можно осуществлять путем определения типа клеточной гибели. Механизмом клеточной гибели в случае мультиформной глиобластомы является коагуляционный некроз, причем его степень есть показатель стадии заболевания (Kleihues et al., 2000; Lacroix et al., 2001). Кроме того, морфологическим признаком мультиформной глиобластомы служат псевдопалисадные клетки. Однако такой способ диагностики проводится *ex vivo* и требует времени, что не подходит для интраоперационного мониторинга.

Еще одним параметром, позволяющим диагностировать наличие раковых клеток, является более интенсивная аутофлуоресценция внутриклеточного НАДН, возбужденная УФ-излучением (Uppal, Gupta, 2003; Villette et al., 2006). Кроме того, было показано, что время жизни и интенсивность аутофлуоресценции клеточных НАДН и ФАД также являются критерием для обнаружения метаболитов клеток на ранних стадиях развития рака. Стоит, однако, отметить, что в зависимости от типа ткани интенсивность флуоресценции в патологической ткани по сравнению с нормой может как увеличиваться (Sinha et al., 2002), так и уменьшаться (Kirkpatrick et al., 2005). Таким образом, явление зависимости аутофлуоресценции НАДН от расположения и развития опухоли в ткани требует дальнейшего изучения. Тем не менее, очевидно, что эндогенные флуорофоры, такие как НАДН и ФАД, могут являться молекулярной мишенью для диагностики онкологических заболеваний, в том числе на ранней стадии.

НАДН и ФАД являются важнейшими метаболическими ко-ферментами мозга (Shen, Lin, 1993), и изменение их концентраций в тканях мозга всегда обусловлено возникновением патологии. Следовательно, определение концентраций НАДН и ФАД путем измерения аутофлуоресценции может служить способом диагностики процессов жизнедеятельности биологических тканей мозга, в частности, по изменениям концентраций этих метаболитов можно определить начало процесса канцерогенеза (Drezek et al., 2001; Ramanujam et al., 2001; Zhang et a1; 2004). Существенным плюсом такого способа диагностики является возможность недеструктивного мониторинга концентрационных изменений с помощью оптических методов. Такая методика измерения интенсивностей аутофлуоресценции НАДН и ФАД и оценки состояния тканей и динамики протекающих процессов по изменению количественного соотношения интенсивностей была предложена еще во второй половине XX века (Chance et al., 1979). Полученное отношение позволяет качественно оценивать уровень клеточной метаболической активности, и очевидно, что уменьшение этого показателя может являться критерием для выявления раковых клеток.

3. Методы интраоперационной спектроскопической навигации

Было реализовано несколько подходов к спектроскопическому анализу биологических тканей *in vivo*, которые можно разделить на две группы. К первой группе методов относится анализ спектров флуоресценции и диффузного отражения с использованием оптоволоконных зондов и спектрометра с дифракционной решеткой в качестве дисперсионного элемента. Вторая группа методов представлена анализом спектрально разрешенных изображений в диффузно отраженном и флуоресцентном свете с использованием набора узкополосных интерференционных фильтров, установленных перед видеокамерой.

Спектроскопический анализ с использованием оптоволоконных зондов основан на разработанном ранее в лаборатории лазерной биоспектроскопии ИОФ РАН методе комбинированного спектроскопического контроля эффективности фотодинамического воздействия (патент РФ № 2169590 (МПК A61N5/06, от 17.03.2000)). В настоящей работе было реализовано две конфигурации спектроанализатора – с одновременной и последовательной регистрацией спектров флуоресценции и диффузного отражения. Для последовательной регистрации использовались источники лазерного излучения с λ=405 нм и λ=473 нм, возбуждающего флуоресценцию практически во всем видимом диапазоне спектра, что позволило проводить анализ как содержания протопорфирина IX, так и эндогенных флуорофоров в нервных тканях. При этом на входе в спектрометр был установлен отрезающий фильтр, подавляющий возбуждающее лазерное излучение настолько, чтобы можно было наблюдать его в том же динамическом диапазоне, что и флуоресцентное излучение. Для учета поглощающих и рассеивающих свойств ткани как с целью исправления спектра флуоресценции, так и для вычисления по нему концентраций основных хромофоров использовалась галогенная лампа, что позволило регистрировать спектр диффузного отражения.

Для одновременной регистрации спектров диффузного отражения и флуоресценции использовался источник лазерного излучения с λ=632,8 нм, возбуждающий флуоресценцию в красном и ближнем ИК-диапазоне. При этом основная часть видимого спектра использовалась для анализа спектра диффузного отражения излучения широкополосного источника (галогенной лампы, излучение которой подавлялось в диапазоне регистрации флуоресцентного сигнала).

Для доставки и приема излучения использован оптоволоконный зонд с центральным осветительным волокном, подводящим к ткани возбуждающее флуоресценцию лазерное излучение, периферийным осветительным волокном, подводящим к ткани широкополосное излучение, и пятью периферийными волокнами, собирающими излучение. Приемные волокна на входе в спектрометр формируют линию, служащую входной щелью спектрометра, для чего позиционируются перпендикулярно плоскости дифракции диспергирующего элемента. Диаметр каждого волокна составляет 200 мкм, что определяет расстояние между центрами волокон, расположенных вплотную друг к другу, которое с учетом оболочек индивидуальных волокон составляет 250 мкм. Числовая апертура каждого волокна равна 0,22.

При обработке спектров диффузного отражения осуществлялась их декомпозиция на компоненты, обусловленные поглощением и рассеянием света тканью. Спектр флуоресценции подвергался нормировке на интенсивность диффузно отраженного лазерного излучения с целью элиминации влияния рассеивающих свойств ткани на величину сигнала флуоресценции (Савельева и др., 2011).

Для исследования основных флуорофоров в нервных тканях в срезах и на клеточных культурах использовался лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM-710-NLO. Клеточные культуры различных опухолей головного и спинного мозга были культивированы в НИИ биологии гена РАН. Клинические исследования разработанных методов проводились в НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко РАМН.

4.Флуоресцентный анализ в нейроонкологии

4.1. Анализ кинетики накопления 5-АЛК-индуцированного Пп IX в аутоидентичных клеточных культурах

Во время проведения операций по удалению глиальных опухолей (НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко) были замечены различия в накоплении протопорфирина IX в опухолях одной степени озлокачествления – мультиформной глиобластомы. Некоторые глиобластомы проявляли столь низкое накопление и, соответственно, уровень флуоресценции Пп IX, что она не визуализировалась во флуоресцентном режиме Blue 400 микроскопа OPMIPENTERO, при этом демонстрируя слабое накопление с помощью спектрального анализа. Глиобластома – это наиболее частая и наиболее агрессивная форма опухоли мозга, поэтому она должна «хорошо» накапливать Пп IX. Но во время операции в одном образце соотношение маркеров было близко к показателям доброкачественных опухолей. Формально назовем образец с

небольшим отношением интенсивностей флуоресценции и рассеянного лазерного излучения «первым» образцом, а с высоким – «вторым».

В связи с этим было решено более подробно изучить механизм накопления Пп IX в клетках. С этой целью был проведен ряд исследований на клеточных культурах соответствующих опухолей. Их целью являлась регистрация изменения концентрации Пп IX в клетках опухолей, показавших различия в накоплении маркера во время операции, с течением времени.

Содержание эндогенных флуорофоров (порфирины, ФАД, НАД·Н, коллаген, эластин, триптофан) в тканях, а также количественные данные об их концентрации и изменении с течением времени дают важную информацию о состоянии клеток тканей. ФАД и НАД·Н участвуют в обменных процессах клеток, поэтому изменение их флуоресценции непосредственно связано с изменениями в окислительно-восстановительных реакциях клеток. Максимум флуоресценции ФАД лежит в диапазоне 520–540 нм, а НАД·Н – 440–470 нм. Также эндогенные флуорофоры применяются для медицинской диагностики, ярким примером является протопорфирин IX (Пп IX), который участвует в процессе биосинтеза гема. Таким образом, Пп IX – отличный маркер, помогающий определить опухоль и ее границы. Для увеличения количества Пп IX в клетках в организм вводится 5-АЛК (5-аминолевулиновая кислота), которая является естественным предшественником Пп IX в синтезе гема. Помимо перечисленных флуорофоров необходимо обратить внимание на другие метаболиты гема (копропорфирин и уропорфирин), которые содержатся в нервных тканях (Lacroix et al., 2001). Данные метаболиты имеют очень схожие с Пп IX спектры флуоресценции с пиками на 613 нм и 619 нм соответственно (http://www.karlstorz.com/cps/rde/xchg/SID-25771F55-1AFCF565/karlstorz-en/hs.xsl/8405.htmn.d.). При возбуждении флуоресценции Пп IX выгорает и образуются фотопродукты (Фп), спектр которых имеет максимумы на 622 и 677 нм. Спектры порфиринов характеризуются значительным перекрытием линий ввиду общности их природы, поэтому их сложно различить между собой. В связи с этим важен анализ кинетики спектральных данных.

Для получения спектральных данных по динамике (с течением времени) накопления Пп IX в клетках соответствующих опухолей использовался комплекс лазерного сканирующего конфокального микроскопа CarlZeiss серии LSM 710. Для возбуждения флуоресценции был выбран лазер с λ=514 нм, для подавления лазерного излучения использовались специальные фильтры. Спектры измеряли в диапазоне 520–750 нм, с шагом 9,7 нм, с интервалом времени 10 минут, для последних проходов интервал времени составил 30–40 минут.

При обработке данных основной целью является определение количества компонент и их концентраций. Для этого был использован метод главных компонент (ГК). Так как целью настоящего исследования было определение реального содержания веществ в клетках опухоли, помимо анализа МГК была проведена линейная декомпозиция спектров с использованием априорной информации, с предположением, что экспериментальные спектры состоят лишь из спектров флуоресценции ФАД, уропорфирина и Пп IX. В соответствии с этим каждая ГК является линейной комбинацией спектров реальных компонент, поэтому ГК были разложены на со-

ставляющие с получением матрицы C(2×2), где строки соответствуют реальным компонентам, а столбцы – ГК.

Исследуемые объекты:

1. Для определения концентрации веществ в мг/мл были проведены измерения на Zeiss LSM 710 пяти стандартных образцов с различной концентрацией Пп IX (10^{-2}–10^{-6} мг/мл).

2. В исследовании приняли участие двое пациентов с глиобластомами, у которых в процессе удаления были выявлены различия в уровне флуоресценции опухолевых тканей. Операции проводились в рамках клинических исследований эффективности интраоперационной диагностики с использованием 5-АЛК на базе НИИ нейрохирургии им. Н.Н. Бурденко. 5-АЛК вводилась пациентам за два часа до начала операции. Операция проводилась с использованием видеофлуоресцентного режима Blue 400 (ZeissOpmiPentero) под спектроскопическим контролем (ЛЭСА-01-БИОСПЕК).

3. Клетки опухолей пациентов были культивированы в Институте биологии гена РАН. Полученные клеточные культуры были разморожены и помещены в питательную среду RPMI для дальнейшего роста. Для увеличения количества Пп IX в клетках была добавлена 5-АЛК с концентрацией 100 мг/мл и pH 7,4, что соответствует благоприятным условиям для жизнедеятельности клеток.

В результате анализа спектральных данных для культуры первого типа была получена кинетическая кривая, приведенная на рис. 1. Значительное изменение концентрации Пп IX наблюдается спустя примерно 60 минут с момента добавления 5-АЛК в образец.

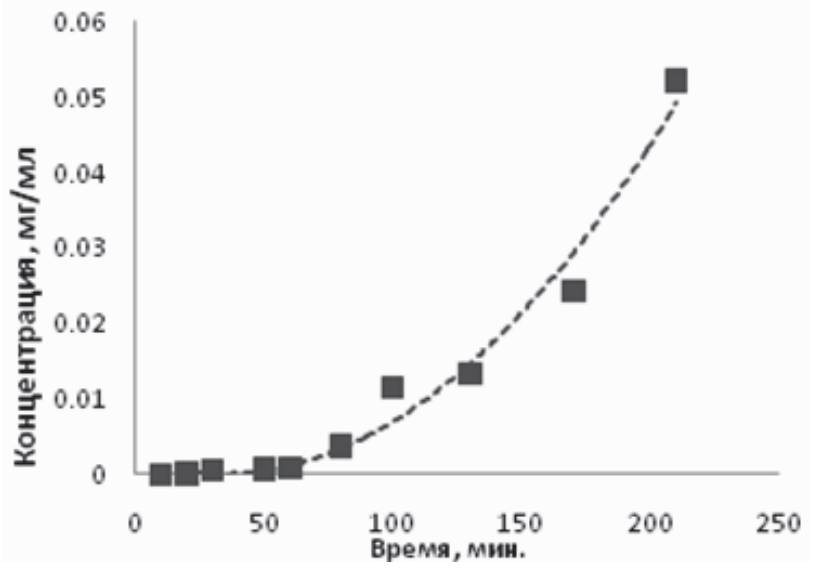


Рис. 1. Изменение концентрации Пп IX в клеточной культуре первого типа после инкубации с 5-АЛК

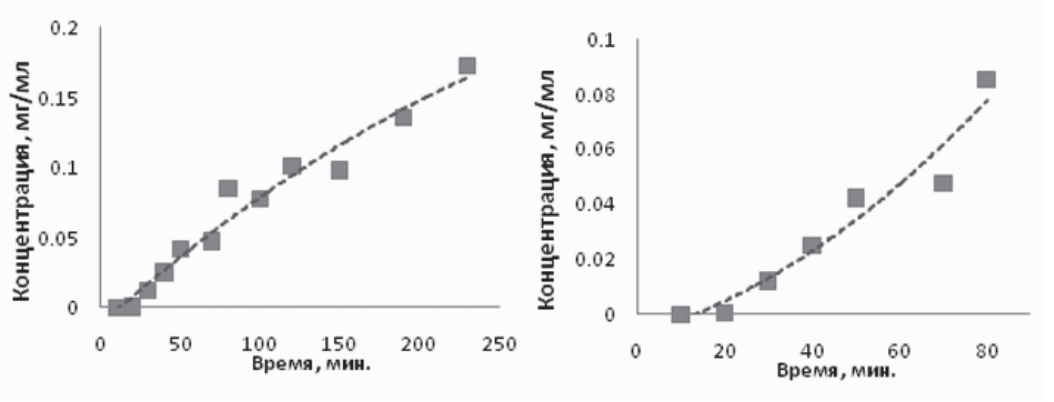


Рис. 2. Изменение концентрации Пп IX в клеточной культуре второго типа после инкубации с 5-АЛК

Слева приведены данные, полученные во временном диапазоне от 10 до 250 минут, справа – начальный этап накопления (от 10 до 80 минут), демонстрирующий сходство кинетической кривой на этом этапе с кинетической кривой для первой культуры, полученной во временном диапазоне от 10 до 250 минут

По спектральным данным второго типа можно наблюдать, что рост концентрации Пп IX происходит значительно быстрей, чем в первом образце, и значительное изменение концентрации Пп IX заметно спустя уже 30 минут с момента добавления 5-АЛК в образец (рис. 2).

Рассматривая общий характер кривых изменения концентрации Пп IX для обоих типов клеточных культур, можно построить следующую зависимость (рис. 3). Изменение концентрации Пп IX для первого образца происходит в области левее точки А, тогда как для второго – охватывает и первую, и вторую области.

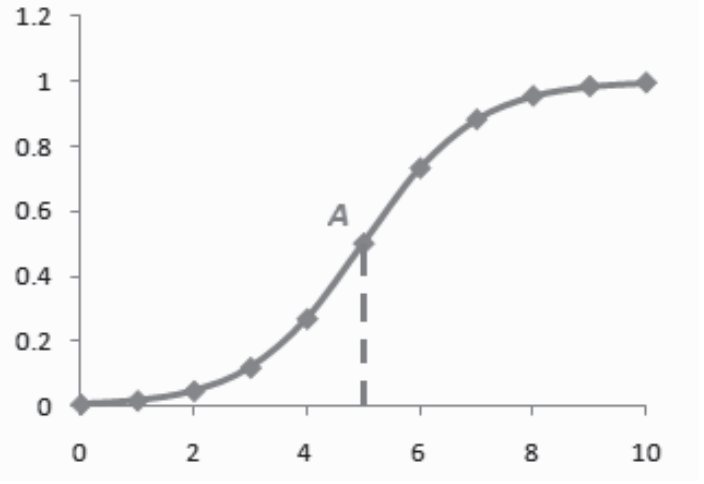


Рис. 3. Сигмоидная кривая, демонстрирующая характер накопления Пп IX в клеточных культурах

Для первого и второго типа клеточных культур можно определить характерные времена, когда концентрация достигает определенных уровней, и оказывается, что отношение характерных времен для первого и второго типов примерно одинаково, в соответствии с чем была предложена математическая модель накопления в клетках Пп IX, учитывающая концентрацию основных ферментов, участвующих в биосинтезе гема.

С использованием этой модели была проведена экстраполяция кинетических кривых за границы диапазона измерений. Было показано, что максимум концентрации Пп IX в клеточной культуре первого типа был бы достигнут примерно спустя 12 часов после добавления 5-АЛК в образец. Следовательно, низкий уровень накопления Пп IX, наблюдавшийся интраоперационно, можно объяснить тем, что между вводом пациенту 5-АЛК и операцией прошло недостаточное количество времени для достижения максимума концентрации Пп IX.

4.2. Метод одновременного спектроскопического анализа эндогенных флуорофоров и 5-АЛК-индуцированного протопорфирина IX, содержащихся в нервных тканях

Были проанализированы спектры флуоресценции и диффузного отражения биологических тканей с целью анализа сораспределения эндогенных флуорофоров и 5-АЛК-индуцированного Пп IX в опухолевых тканях.

Исследуемые спектры обрабатывались с учетом флуоресценции и поглощения флуорофоров и ALA-индуцированного Пп IX в соответствии с выражением:

$$I(\lambda)=(\Sigma_i I_i(\lambda)\times C_i)\times\exp(-d\Sigma_j \varepsilon_j(\lambda)C_j),$$

где $I(\lambda)$ – регистрируемая спектральная зависимость; $I_i(\lambda)$ – спектр флуоресценции i-го компонента; C_i – концентрация i-го компонента; d – длина пути фотонов в ткани от источника до приемника излучения; $\varepsilon_j(\lambda)$ – коэффициент молярной экстинкции i-го компонента.

Результаты декомпозиции спектров, полученных *in vivo*, были верифицированы посредством морфологического исследования соответствующих образцов биологического материала.

Было показано повышение уровня содержания ФАД в опухолевых тканях по сравнению с нормальной глией. Также был обнаружен рост сигнала флуоресценции НАДН при переходе от зоны гиперплазии белого вещества головного мозга к опухолевой ткани с признаками некроза. Этот участок показал низкий уровень, сравнимый с нормальным, накопления протопорфирина IX вследствие некротических изменений, препятствующих метаболизму гема, однако соотношение сигналов эндогенных флуорофоров отличало его от здоровой ткани однозначным образом.

5. Комбинированный спектроскопический анализ нервных тканей по спектрам флуоресценции и диффузного отражения *in vivo*

5.1. Зависимость рассеивающих свойств нервных тканей и накопления ими 5-АЛК-индуцированного протопорфирина IX от степени их малигнизации

С морфологической точки зрения, основными отличиями опухолевой ткани являются размер и концентрация клеточных ядер. Этот критерий общепринят при определении степени малигнизации ткани в морфологических лабораториях. Авторами было рассмотрено влияние на сигнал диффузного отражения, регистрируемый устройством ЛЭСА-01-БИОСПЕК с волоконно-оптическим зондом, основных рассеивателей, содержащихся в нормальных глиальных тканях и глиальных опухолях.

Были рассмотрены сплошные сферические рассеиватели двух сортов – 0,5 и 5 мкм в диаметре, и сплошные бесконечные цилиндрические рассеиватели диаметром 1 мкм, соответствующие митохондриям, ядрам и миелинизированным нервным волокнам. Были исследованы локальные изменения светорассеивающих свойств и накопления опухолевого маркера (5-АЛК-индуцированного протопорфирина IX) в тканях пациента во время удаления опухоли. Для этого проводилось сопоставление данных спектроскопического исследований *in vivo* в различных участках опухоли с последующим забором гистологического материала из этих же участков с их морфологическими характеристиками. При этом в рамках одного исследования производилось взятие около 20 биоптатов.

В процессе клинических исследований было замечено, что при продвижении вглубь опухоли нарастание сигнала флуоресценции, как правило, сопровождается спадом сигнала рассеяния. Этот эффект обусловлен тем, что соответствующие структурные и метаболические изменения имеют общую причину – быстрый рост опухоли, приводящий к дефициту феррохелатазы и нарушению структурной целостности белого вещества.

Сопоставление результатов численного моделирования распространения лазерного излучения в комплексной среде, содержащей рассеиватели, параметры которых соответствуют основным структурным элементам нервных тканей, и в качестве основного хромофора – гемоглобин, и данных спектроскопического исследования, проведенного *in vivo*, показало хорошее соответствие разработанной математической модели и клинических данных (табл.).

Как видно из приведенных выше результатов, как в численном эксперименте, так и при спектроскопических исследованиях *in vivo*, наблюдались различия в светорассеивающих свойствах для центра и края опухоли различной степени злокачественности. Светорассеяние центральной части опухоли доброкачественных новообразований ниже, чем у глиобластомы, однако в обоих случаях эта величина значительно ниже, чем светорассеивающие свойства нормального белого вещества. Это можно объяснить конкурирующими эффектами, имеющими место на тканевом уровне при развитии опухоли, сказывающимися на сигнале рассеяния. Постепен-

Таблица

Сопоставление данных имитационного моделирования и результатов спектроскопии *in vivo*

Диффузное отражение по отношению к нормальной ткани		Степень II-III		Степень IV	
		центр опухоли	край опухоли	центр опухоли	край опухоли
Монте-Карло	632,8 нм	0,22±0,001	0,41±0,002	0,56±0,001	0,28±0,001
In vivo		0,21±0,02	0,37±0,02	0,53±0,02	0,26±0,02

ная демиелинизация нервных волокон, их смещение и деструктуризация, а также падение содержания митохондрий вследствие перехода опухолевых клеток с окислительного фосфорилирования на гликолиз, приводят к снижению сигнала рассеяния, в то время как увеличение размеров и плотности ядер ведет к его увеличению. Для различных участков опухоли одного пациента этот эффект можно проследить, сравнивая центральную часть опухоли и ее край, где указанные изменения менее выражены, чем в центре. Здесь мы видим обратную картину. Край опухоли доброкачественных новообразований проявляет более высокие рассеивающие свойства по сравнению с краем глиобластомы, поскольку в этой области в первом случае еще не наблюдается значительной деструктуризации миелинизированных волокон и спад сигнала рассеяния обусловлен в наибольшей степени метаболическими изменениями, приводящими к оскудению внутриклеточного состава, в то время как во втором случае уже проявляются все компоненты, приводящие к спаду сигнала рассеяния, но плотноклеточность не так выражена, как в центре опухоли.

5.2. Комбинированный спектроскопический метод определения границ опухоли в нейроонкологии

С учетом всех вышеперечисленных особенностей взаимодействия излучения с биологическими тканями был разработан и апробирован в клинических условиях метод комбинированной спектроскопической диагностики. В результате сопоставления данных интраоперационного спектроскопического анализа, проводимого *in vivo* в зоне циторедукции, и гистологической экспертизы образцов ткани, взятых из тех же областей, были получены данные о соответствии исследуемых спектроскопических характеристик типу ткани. Ниже приведены спектральные зависимости и вычисляемые по ним диагностические параметры, полученные у одного пациента в процессе удалении опухоли (рис. 4).

Множественные спектроскопические измерения, производимые во время операции, показали плавные изменения исследуемых характеристик в направлении от здоровой ткани к центру опухоли, подчиняющиеся определенным закономерностям. На рис. 5 приведены диаграммы, иллюстрирующие эти тенденции. Все данные приведены в относительных единицах – по отношению к значениям соответствующих параметров интактного мозга.

Результаты показали отсутствие накопления Пп IX, высокий уровень рассеяния и кровенаполнения, низкий уровень оксигенации для участков опухоли, в которых

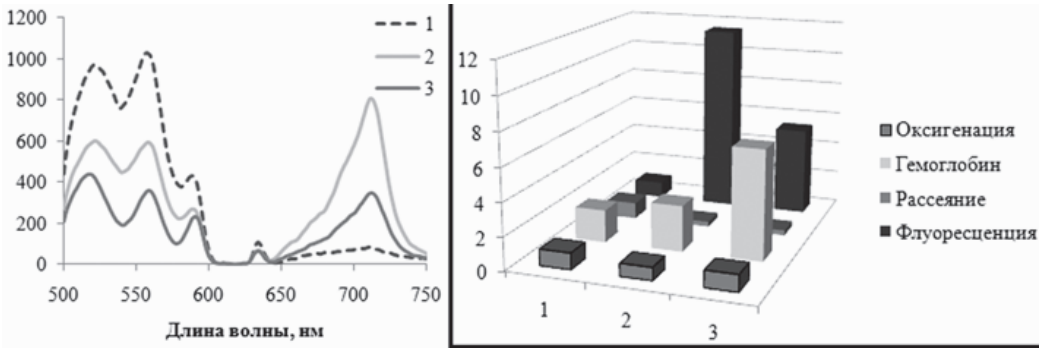


Рис. 4. Пример спектральных зависимостей, регистрируемых интраоперационно и вычисляемых по ним характеристик, полученных во время удаления глиобластомы со спектроскопическим контролем

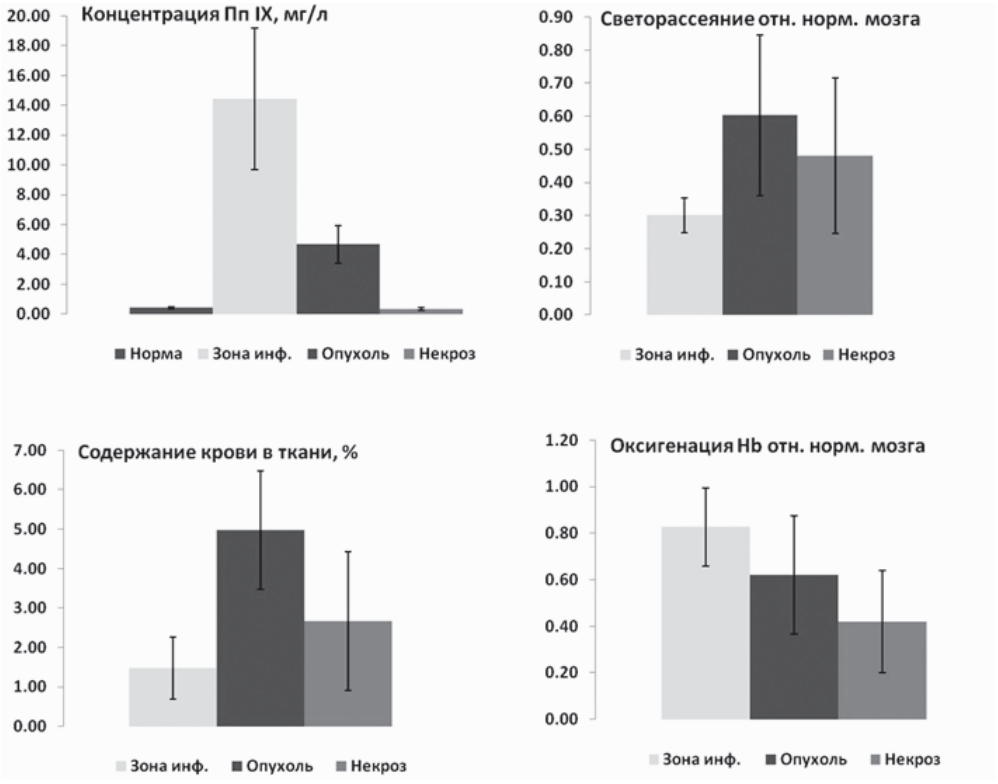


Рис. 5. Распределение исследуемых биохимических и структурных опухолевых маркеров по различным типам опухолевых тканей (все значения приведены относительно интактного мозга)

преобладал некроз. Для этих участков уместнее оперировать термином «концентрация гемоглобина» вместо термина «кровенаполнение», поскольку в некротических тканях высокое значение этого параметра, скорее всего, достигается за счет геморрагий.

Для образцов ткани из центра опухоли с микроскопическими включениями некроза был показан флуоресцентный контраст по сравнению со здоровой корой, равный 7±1,7, уменьшение плотности ткани более чем вдвое по сравнению с нормой, кровенаполнение, превышающее среднее в 6 раз, и уровень оксигенации, составляющий 60% от значений соответствующих параметров интактного мозга. Ткань из центра опухоли без признаков некроза показала сходные характеристики, за исключением кровенаполнения, которое оказалось ниже. Зоне инфильтрации соответствовал максимальный уровень накопления Пп IX (в 10±3 раз выше, чем в норме), наименьшая плотность ткани, кровенаполнение, вдвое превышающее норму, и самый высокий уровень оксигенации, близкий к таковому интактного мозга.

Избирательное накопление Пп IX в опухолевых тканях по сравнению с нормальными обусловлено рядом ферментативных нарушений в быстро пролиферирующих клетках опухоли. Как показали исследования, содержание протопорфирина IX в глиальных опухолях головного мозга является высокоспецифичным критерием для демаркации границ опухоли, а также определения степени ее озлокачествления. Также было показано, что накопление Пп IX коррелирует с индексом пролиферации, что объясняет высокий уровень в активно растущей части опухоли в зоне инфильтрации, несколько заниженные его значения в центре опухоли, и отсутствие накопления Пп IX в зоне некроза.

Падение коэффициента рассеяния в зоне инфильтрации при высоком уровне оксигенации позволяет сделать предположение о том, что этот эффект обусловлен нарушением мембранных структур белого вещества. В то же время, в центре опухоли наряду с этими изменениями происходит и падение оксигенации, Варбург-эффект, понижение числа митохондрий, на фоне которого в то же время наблюдается рост числа и размеров ядер. Первые два эффекта приводят к понижению рассеяния, третий – к повышению. Таким образом, мы видим результат конкуренции этих процессов. В зоне некроза образуются в достаточно большом количестве микропузырьки, что может способствовать повышению уровня рассеяния. Таким образом, рассеивающие свойства достигают минимума по периферии опухоли, что делает этот критерий наиболее информативным при поиске границ опухоли.

В полученных нами данных можно увидеть общую тенденцию падения оксигенации при движении от интактного мозга через зону инфильтрации и собственно опухоль – к некрозу. Однако следует учитывать то обстоятельство, что этот критерий является чрезвычайно чувствительным к механическому воздействию и может демонстрировать заниженные значения доброкачественных тканей.

Результаты измерения кровенаполнения позволяют объединить исследуемые нами четыре типа тканей в две группы, поскольку не было обнаружено статистически значимых различий в кровенаполнении между центром опухоли с некрозами и преимущественно некрозом, так же как между центром опухоли и зоной инфильтрации, в то время как между собой эти две группы отличаются в два с половиной раза. Эти результаты хорошо соотносятся с приведенным выше анализом результатов измерения кровенаполнения и плотности сосудов различных глиальных опухолей, выполненных с использованием различных методов измерения. В целом можно заключить, что более малигнизованные участки опухоли характеризуются

более высоким уровнем кровенаполнения и пониженным уровнем оксигенации по сравнению с краем опухоли (под краем в данном случае понимается группа, объединяющая зону инфильтрации и часть опухоли, лишенную признаков некротических изменений).

6. Перспективы развития методов оптической спектроскопии в нейроонкологии

6.1. Развитие метода комбинированной спектроскопии с использованием различных типов оптоволоконных зондов

Оптоволоконные устройства открывают широкие возможности для их интеграции со стандартным нейрохирургическим инструментарием. Сопряжение оптоволоконного зонда с аспиратором (рис. 6, слева) позволяет производить одновременную диагностику состояния тканей и их деструкцию. При этом спектроскопический анализатор встроен в звено обратной связи. Благодаря такому подходу, объединяющему диагностическое устройство и хирургический инструмент, удается добиться управляемой деструкции тканей. Использование оптоволоконного устройства с биполярным коагулятором позволяет производить измерения на различных расстояниях между осветительным и приемным волокнами, варьируя таким образом глубину проникновения излучения в ткань. Особое значение приобретает оценка параметров гемодинамики в области, прилежащей к зоне коагуляции (рис. 6, справа).

Сопряжение оптоволоконного зонда со стереотаксическим инструментарием (рис. 7) позволяет добиться высокой точности позиционирования канюли в объеме мозга. Постоянный контроль концентрации и степени оксигенации гемоглобина

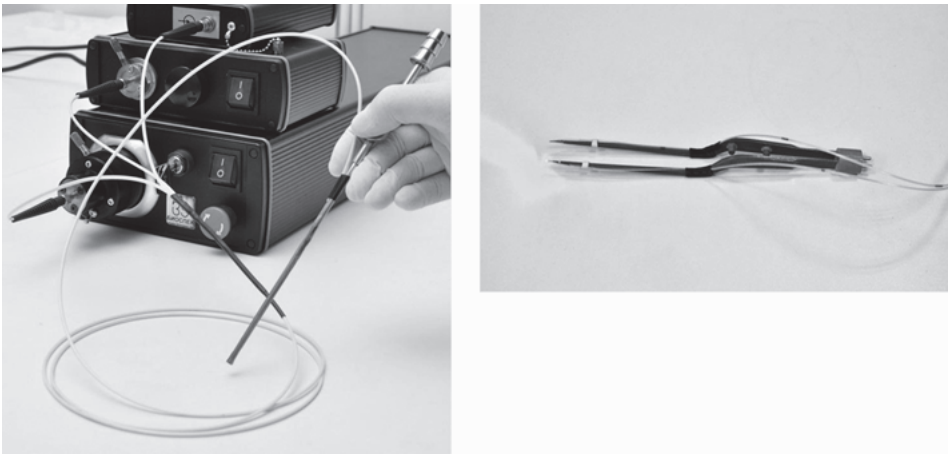


Рис. 6. Оптоволоконные зонды, сопряженные с нейрохирургическим аспиратором и биполярным коагулятором

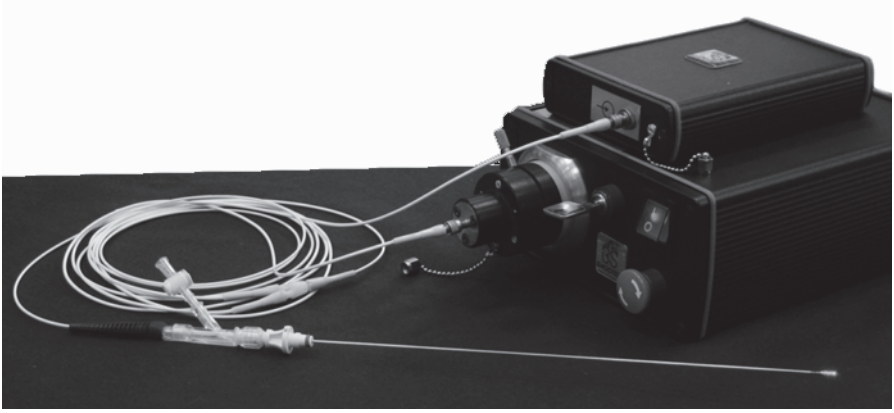


Рис. 7. Оптоволоконный зонд, сопряженный с канюлей, для стереотаксической биопсии

позволяет избежать повреждения крупных сосудов. Анализ уровня флуоресценции опухолевого маркера способствует взятию образца ткани из наиболее агрессивного участка опухоли.

6.2. Анализ спектрально разрешенных изображений в нейроонкологии

Комбинированный метод регистрации спектрально разрешенных изображений реализуется как в окне биологической прозрачности, где производится анализ флуоресцентного сигнала, так и в зеленом диапазоне видимого спектра, в котором достаточно сильно поглощение гемоглобина.

В лаборатории лазерной биоспектроскопии разработан метод регистрации спектрально разрешенных изображений в диффузно отраженном свете с использованием набора узкополосных интерференционных фильтров, соответствующих в максимуме пропускания пикам поглощения основных тканевых хромофоров. Для анализа содержания и оксигенации гемоглобина в тканях использовались интерференционные фильтры с максимумами пропускания на длине волны 542, 560, 576, 586 и 596 нм, позволяющие регистрировать изображения в оптических диапазонах, соответствующих характерным точкам спектра поглощения гемоглобина.

Также разработаны метод и устройство одновременной регистрации флуоресцентного видеоизображения в красном и ближнем ИК-диапазоне с наложением на полноцветную картину в диффузноотраженном свете (рис. 8).

6.3. Новые флуоресцентные маркеры и фотосенсибилизаторы для целей нейроонкологии

Одной из наиболее динамично развивающихся областей биофотоники является разработка наноматериалов и методов их мониторинга в организме. Благодаря



Рис. 8. Устройство визуализации флуоресценции 5-АЛК-индуцированного протопорфирина IX на фоне полноцветного изображения операционного ложа

возможности конструирования наночастиц с заданными свойствами можно обеспечить как различные механизмы из взаимодействия с биологическими структурами тканей и клеток, так и определенные оптические свойства, способствующие не только их наилучшему обнаружению в биологической ткани, но также опосредующие различные варианты фотохимического воздействия.

Фотодинамическая терапия является методом высокоселективного воздействия на опухолевые ткани и является одним из передовых подходов к решениям задач нейроонкологии. Принцип фотодинамического воздействия заключается в фотохимической реакции, которая происходит при поглощении молекулой фотосенсибилизатора, накопившегося в ткани, кванта света и ее последующем переходе в возбужденное состояние, из которого она может релаксировать несколькими способами, одним из которых является испускание кванта флуоресцентного излучения, другим – передача энергии другой молекуле. Молекула кислорода при передаче ей возбуждения от фотосенсибилизатора переходит в синглетное состояние и приобретает высокую реакционную способность. Ввиду малого радиуса действия синглетного кислорода (порядка 0,02 мкм) вследствие его быстрого гашения в биологических системах первыми поражаются внутриклеточные структуры, непосредственно содержащие фотосенсибилизатор, или близкие к ним, преимущественно хорошо оксигенированные. Эта локальность обеспечивает высокую селективность фотодинамического воздействия при условии специфического накопления фотосенсибилизатора в клетках опухоли. Помимо 5-АЛК наиболее активно используются сей-

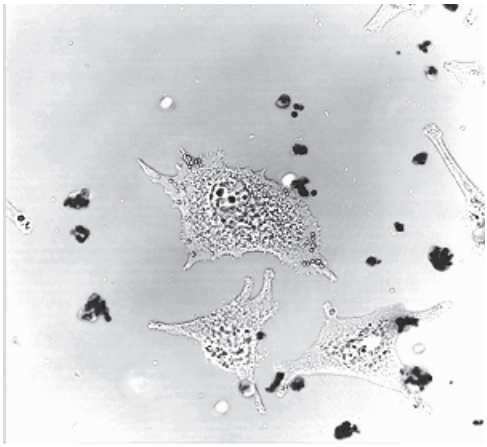


Рис. 9. Диссоциация наночастиц метилфеофорбида (НЧ) в мембранах клеток глиобластомы (LSM-710)

Длина волны флуоресцентного излучения молекулярной (М) и наноформы метилфеофорбида отличается, благодаря чему можно наблюдать процесс диссоциации наночастиц на молекулы при прохождении через клеточные мембраны. Длина волны, соответствующая пику поглощения молекулярной формы, обеспечит высокую селективность фотодинамического воздействия

час такие фотосенсибилизаторы как производные гематопорфирина, феофорбиды. Использование наноформ упомянутых фотосенсибилизаторов открывает новые возможности их доставки к цели фотодинамического воздействия, селективности терапии и мониторинга ее эффективности (рис. 9).

Интерес также представляет возможность конъюгации флуоресцентных маркеров и фотосенсибилизаторов с антителами к опухолевым генам, что обеспечивает таргетную доставку действующего вещества в опухоль.

Совместно с ФГБУ «Государственный научный центр социальной и судебной психиатрии им. В.П. Сербского» был проведен ряд работ по исследованию сорас-

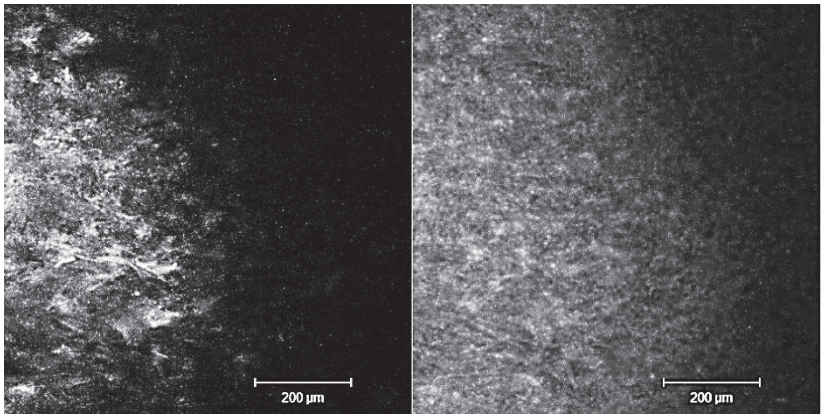


Рис. 10. Сравнительный анализ накопления Пп IX (слева) и мембранных трейсеров dil18 (справа) в глиоме

пределения в опухолевых тканях 5-АЛК-индуцированного протопорфирина IX и антител к коннексину, меченых флуоресцентным красителем из серии Alexa, показавший различия в характере накопления этих агентов в перифокальной зоне. Также был проведен сравнительный анализ накопления Пп IX и мембранных трейсеров dil18 в глиоме и периопухолевом пространстве в диагностике опухолевых клеток при интраоперационной навигации. Глиомные клетки С6, меченые мембранным трейсером Dil18, имплантировались в мозг крыс. В процессе роста в головном мозге после имплантации метка сохраняется, на иллюстрации видно, как далеко инфильтрируются глиомные клетки от основного очага перифокальной зоне (рис. 10).

Проведенные исследования демонстрируют важность междисциплинарных работ на стыке физики, химии и биологии для развития новых методов диагностики и терапии заболеваний головного и спинного мозга.

Литература

Борисов К.Е., Сакаева Д.Д. Возможности и перспективы антигенной терапии мультиформной глиобластомы. // Российский онкологический журнал. 2011. № 1. Р. 43-49.

Савельева Т.А., Рябова А.В., Андреева И.В., Калягина Н.А., Конов В.И., Лощенов В.Б. Комбинированный спектроскопический метод определения концентрации флуорофоров в сильнорассеивающих средах. // Краткие сообщения по физике. 2011. № 11. Р. 30-38.

Смирнова З.С., Халанский А.С., Родионова Ю.В., Герасимова Г.К. Изучение отечественных противуопухолевых препаратов на экспериментальных опухолях головного мозга // Российский биотерапевтический журнал. 2004. Вып. 3. № 3. Р. 49-55.

Beauvoit B., Chance B. Time-resolved spectroscopy of mitochondira, cells and tissues under normal and pathological conditions // Mol. Cell. Biochem. 1998. Vol. 184.P. 445.

Beauvoit B., Kitai T., Chance B. Contribution of the mitochondrial compartment to the optical propertires of the rat liver: a theoretical and practical approach // Biophys. J. 1994. Vol. 67. P. 2501.

Beauvoit B., Evans S.M., JenkinsT.W. et al. Correlation between the light scattering and the mitochondrial content of normal tissues and transplantable rodent tumor. // Analytical Biochemistry. 1995. Vol. 226. P. 167-174.

Brady S.T., Siegel G.J., Alberts R.W., Price D.L. Basic neurochemistry: Principles of molecular, cellular and medical neurobiology. 8th. Ac. Press. Elsevier, 2011.

Brat D.J. Mechanisms of tumor progression: angiogenesis, hypoxia, and invasion // Conf. Proceedings of the American Society of Neuroradiology: Integration of Imaging Strategies in Neuroradiology. 2004. P. 1-8.

Brunberg J.A., Chenevert T.L., McKeever P.E. et al. In vivo MR determination of water diffusion coefficients and diffusion anisotropy: correlation with structural alteration in gliomas of the cerebral hemispheres // AJNR Am. J. Neuroradiol. 1995. Vol. 16. P. 361-371.

Candolfi M., Curtin J.P., Nichols W.S. et al. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression // J. Neurooncol. 2007. V0l. 85. № 2. P. 133-148.

Chance B., Schoener B., Oshino R. et al. Oxidation-reduction ratio studies of mitochondria in freeze-trapped samples. NADH and flavoprotein fluorescence signals // J. Biol. Chem. 1979. Vol. 10. P. 4764-4771.

Drezek R., Brookner C., Pavlova I. et al. Autofluorescence microscopy of fresh cervical-tissue sections reveals alterations in tissue biochemistry with dysplasia // Photochem. Photobiol. 2001. Vol. 73. P. 636-641.

Evans S.M. et al. Hypoxia Is Important in the Biology and Aggression of Human Glial Brain Tumors // Clin. Cancer. Res. 2004. № 10. P. 8177.

Gabriel A-M. Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in gliomas and their vascular microenvironment // Biochim. Biophys. Acta (BBA). Bioenergetics. 2011. Vol. 1807. P. 602-608.

Gibbs-Strauss S.L., O'Hara J.A., Srinivasan S. et al. Diagnostic detection of diffuse glioma tumors in vive with molecular fluorescent probe-based transmission spectroscopy // Med. Phys. 2009. Vol. 36. P. 974-983.

Giese A., Bjerkvig R., Berens M.E., Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment // J. Clin. Oncol. 2003. Vol. 21. № 8. P. 1624-1636.

Heikal A.A. Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies // Biomark. Med. 2010. Vol. 4. P. 241-263.

Johansen-Berg H., Behrens T.E.-G. Diffusion MRI: from quantitative measurement to in vivo neuroanatomy. Ac. Press, Elsevier, 2009.

Kirkpatrick N.D., Zou C., Brewer M.A. et al. Endogenous fluorescence spectroscopy of cell suspensions for chemopreventive drug monitoring // Photochem. Photobiol. 2005. Vol. 81. P. 125-134.

Kleihues P., Burger P.C.,Collins V.P. Glioblastoma // Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System. P. Kleihues, W.K. Cavenee, 29-39. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2000.

Lacroix, M. et al. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival // J. Neurosurg. 2001. Vol. 95. P. 190-198.

LeBihan D. et al. Diffusion tensor imaging: concepts and applications // J Magn. Reson. Imaging. 2001. Vol. 13. P. 534-546.

Lin W.C., TomsS.A., Johnson M. High-grade glioma surgery // J. Biomed. Opt. 2011. Vol. 16. № 11. P. 116007.

Oudard S., Boitier E., Miccoli L. et al. Gliomas are driven by glycolysis: putative roles of hexokinase, oxidative phosphorylation and mitochondrial ultrastructure // Anticancer Res. 1997. Vol. 17. № 3C. P. 1903-1911.

Pogue B.W., Gibbs-Strauss S., Valdés P.A. et al. Review of Neurosurgical Fluorescence Imaging Methodologies // IEEE J. Sel. Top. Quantum. Electron. 2010. Vol. 16. № 3. P. 493–505.

Potapov A.A., Loshakov V.A., UsachevD.J. Intraoperative multimodal navigation including laser fluorescence spectroscopy in surgery of malignant brain tumors // Materials of 14th European Congress of Neurosurgery. Rome, Italy, 2011.

Pysh J.J., Khan T. Variations in mitochondrial structure and content of neurons and neuroglia in rat brain: An electron microscopic study // Brain Res. 1972. Vol. 36. № 1. P. 1-18.

Ramanujam N., Richards-Kortum R., Thomsen S. et al. Low temperature fluorescence imaging of freeze-trapped human cervical tissues // Opt. Express. 2001. Vol. 12. P. 335-343.

Roberts D.W., Waldes P.A., Harris B.T. et al. Coregistered fluorescence-enhanced tumor resection of malignant glioma: relationships between δ-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence, magnetic resonance imaging enhancement, and neuropathological parameters // Clinical Article J. Neurosurg. 2011. Vol. 114. P. 595-603.

Sarkar C., Jain A., Suri V. Current concepts in the pathology and genetics of gliomas // Indian J. Cancer. 2009. Vol. 46. № 2. P. 108-119.

Scatliff J.H., RadcliffeW.B., Pittman H.H., Park C.H. Vascular structure of glioblastomas // Am. J. Roentgenol. Radium. Ther. Nucl. Med. 1969. Vol. 105. № 4. P. 795-805.

Schiffer D. Brain tumor pathology: Current diagnostic hotspots and pitfalls. Springer, 2006.

Shen Z., Lin S. Laser-fluorescent pulses as a probe to brain energy and efficiency // SPIE Low-Energy Lasers Effects on Biological Systems. 1993. P. 1883.

Sinha S., Bastin M.E., WhittleI.R., Wardlaw J.M. Diffusion tensor MR imaging of highgrade cerebral gliomas // AJNR Am. J. Neuroradiol. 2002. Vol. 23. P. 520-527.

Stummer W., Beck T., Beyer W. et al. Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report // J. Neurooncol. 2008. Vol. 87. P. 103-109.

Takahashi J.A., Fukumoto M., Igarashi K,, Oda Y,, Kikuchi H., Hatanaka M. Correlation of basic fibroblast growth factor expression levels with the degree of malignancy and vascularity in human gliomas // J. Neurosurg. 1992. Vol. 76. P. 792-798.

Takano S., Yoshii Y., Kondo S. et al. Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients // Cancer Res. 1996, Vol. 56. P. 2185-2190.

Tonn J.C, Goldbrunner R. Mechanisms of glioma cell invasion // Acta Neurochir. Suppl. 2003. Vol. 88. P. 163-167.

Uppal A., Gupta P.K. Measurement of NADH concentration in normal and malignant human tissues from breast and oral cavity // Biotechnol. Appl. Biochem. 2003. Vol. 37. № 1. P. 45-50.

Valdés P.A., Kim A., Leblond F. et al. Combined fluorescence and reflectance spectroscopy for in vivo quantification of cancer biomarkers in low- and high-grade glioma surgery // J. Biomed. Opt. 16. 2011a. № 11. P. 116007.

Valdés P.A., Kim A., Blantsch M. et al. δ-aminolevulinic acid–induced protoporphyrin IX concentration correlates with histopathologic markers of malignancy in human gliomas: the need for quantitative fluorescence-guided resection to identify regions of increasing malignancy // Neuro Oncol. 2011b. Vol. 13. № 8. P. 846-856.

Villette S., Pigaglio-Deshayes S., Vever-Bizet C., Validire P., Bourg-Heckly G. Ultraviolet-induced autofluorescence characterization of normal and tumoral esophageal epithelium cells with quantitation of NAD(P)H // Photochem. Photobiol. Sci. 2006. Vol. 5. P. 483-492.

Weidner N. Tumoural vascularity as a prognostic factor in cancer patients: the evidence continues to grow // J. Pathol. 1998. Vol. 184. № 2. P. 119-22.

Zhang Z. et al. Metabolic imaging of tumors using intrinsic and extrinsic fluorescent markers // Biosens. Bioelectron. 2004. Vol. 15. P. 643-650.

Электронный ресурс:

http://www.karlstorz.com/cps/rde/xchg/SID-25771F55-1AFCF565/karlstorz-en/hs.xsl/8405.htm. б.д.

http://www.surgicalmicroscopes.com/product/zeiss-pentero-microscope. б.д.

Глава 3

ЛЕЧЕНИЕ

Нейролипины – эндогенные нейропротекторы при ишемии мозга и основа для создания новых гибридных мультифункциональных препаратов

М.Ю. Бобров, Н.М. Грецкая, М.Г. Акимов, В.В. Безуглов

Содержание

1. Введение
2. Нейропротекторное действие нейролипинов и их аналогов
3. Нейролипины – лиганды каннабиноидных рецепторов
4. Влияние ацилированных производных дофамина и серотонина на гидролиз анандамида
5. Антиоксидантные свойства N-ацилдофаминов и N-ацилсеротонинов
6. Нейропротекторный потенциал представителей семейства нейролипинов
7. Влияние нейролипинов на нейрональный апоптоз
8. Влияние нейролипинов на жизнеспособность и функционирование нейронов на модели глутаматной нейротоксичности (ГНТ)
9. Защитное действие нейролипинов при гипоксии
10. Роль КР1 в процессах синаптической пластичности
11. Защитное действие нейролипинов при окислительном стрессе
12. Эффекты N-арахидоноилдофамина при гипоксии in vivo
13. Защитное действие N-ацилдофаминов при фокальной ишемии
14. Влияние N-ацилдофаминов на локальный мозговой кровоток
15. Антиагрегационное действие амидов жирных кислот с дофамином и серотонином
16. Нейрозащитное действие простамида и его аналогов
17. Онкотоксическое действие нейролипинов
18. Нейролипины – мультифункциональные нейрозащитные вещества
19. Гибридные мультифункциональные вещества на основе нейролипинов

1. Введение

Нейродегенеративные процессы, наблюдающиеся при инсультах, травмах, при болезнях Паркинсона и Альцгеймера и ряде других, сопровождаются прогрессивно нарастающей гибелью нервных клеток головного мозга. Данные многочисленных исследований последних лет свидетельствуют о том, что эти процессы обус-

---

Сокращения: АДА – N-арахидоноилдофамин; АСТ – N-арахидоноилсеротонин; ВП – внеклеточный потенциал; ГАЖК – гидролаза амидов жирных кислот; ДДА – N-докозагексаеноилдофамин; ЭСТ – N-эйкозапентаеноилсеротонин; ВР1 – ванилоидные рецепторы 1-го типа; КР1 – каннабиноидные рецепторы 1-го типа; КР2 – каннабиноидные рецепторы 2-го типа; 2АГ – 2-арахидоноилглицерин.

ловлены каскадом взаимосвязанных реакций: нарушением клеточного метаболизма и функционирования митохондрий, изменением синаптической проводимости, оксидативным стрессом и токсическим действием избытка возбуждающих аминокислот. Тем не менее, ассортимент имеющихся в наличии эффективных нейропротекторов весьма скромен и явно недостаточен для успешной фармакологической коррекции нейрональной дегенерации. Поэтому поиск новых нейропротекторов и разработка стратегий защиты нейронов остается весьма актуальной и социально значимой задачей.

В последнее время пристальное внимание уделяется изучению роли нейролипинов в нейродегенеративных процессах, и в частности – при ишемии головного мозга. Нейролипины представляют собой семейство эндогенных производных жирных кислот, обладающих нейрорегуляторными свойствами. К нейролипинам относят амиды жирных кислот с биогенными аминами, а также моноэфиры жирных кислот с глицерином. Наиболее активно на сегодняшний день изучаются такие нейролипины, как N-арахидоноилэтаноламин (анандамид) и 2-арахидоноилглицерин (2АГ). Установлены пути их биосинтеза, а также инактивации за счет ферментативного гидролиза и внутриклеточного транспорта (Petrocellis, 2004). Эти соединения исходно были обнаружены в нервной ткани как эндогенные лиганды каннабиноидных рецепторов (Devane et al., 1992; Sugiura et al., 1995), которые участвуют в передаче нервного импульса и в процессах нейрональной пластичности за счет регуляции выброса нейромедиаторов (Castillo et al., 2012). Было показано, что нейролипины и их рецепторы участвуют в регуляции процессов обучения, памяти, обмена веществ, терморегуляции и болевой чувствительности (Mechoulam, Parker, 2012; Bermudez-Silva et al., 2010; Guindon, Hohmann, 2009). Участие нейролипинов в широком спектре физиологических реакций дало основание полагать, что они могут играть существенную роль в патологических процессах при нейродегенерации. Исследования показали, что в тканях мозга после ишемии возрастает количество N-ацилэтаноламинов и 2АГ, а также происходит повышение экспрессии каннабиноидных рецепторов (Degn et al., 2007; Berger et al., 2004; Zhang et al., 2008). Генетическая блокада каннабиноидных рецепторов у мышей приводит к более выраженным повреждениям нервной ткани при экспериментальной ишемии по сравнению с их нормальными сородичами (Parmentier-Batteur et al., 2002). Накопленные данные позволили сформулировать концепцию о том, что нейролипины совместно со своими рецепторами и ферментами метаболизма, а также белками внутриклеточной сигнализации составляют единую систему, препятствующую развитию патологической гибели нейронов при ишемии.

Помимо анандамида в организме млекопитающих были обнаружены амиды жирных кислот с другими биогенными аминами, например нейротрансмиттерами. Так, из нервной ткани млекопитающих были выделены амиды жирных кислот с дофамином (N-арахидоноилдофамин, АДА), ГАМК и глицином (Huang et al, 2001, 2002). N-арахидоноилсеротонин (АСТ) был выделен из стенки кишечника и в настоящее время рассматривается как эндогенное соединение (Verhoeckx et al., 2011). Таким образом, ацилирование биогенных аминов жирными кислотами является новым биохимическим путем, приводящим, с учетом разнообразия жирных

кислот, к формированию большого семейства эндогенных биоактивных липидов. Биохимические свойства, молекулярные мишени, а также возможная роль большинства представителей семейства нейролипинов в нейродегенеративных процессах остаются до сих пор недостаточно изученными.

В данной работе суммированы результаты исследований роли нейролипинов как эндогенных факторов, противодействующих развитию патологических процессов при ишемии мозга. Это позволило предложить концепцию принципиально новых лекарственных препаратов, в структуре которых сочетаются молекулы нейролипинов и других биологически активных соединений: пептидов, биогенных аминов и оксида азота (в виде органических нитратов).

2. Нейропротекторное действие нейролипинов и их аналогов

Для характеристики биохимических свойств и для определения нейропротекторного потенциала были синтезированы и изучены эндогенные нейролипины и их разнообразные аналоги (рис. 1):

– 2-арахидоноилглицерин и его аналоги: эфиры арахидоновой кислоты (***1d***) с 1,3-дифтор (***2b***), 1,3-динитро (***2c***) производными глицерина (***2a***);

– анандамид: амид арахидоновой кислоты (***1d***) с этаноламином (***3a***) и его гибридные аналоги: эфир арахидоновой кислоты с этиленгликолем (***3b***) и амид арахидоновой кислоты с аминопропандиолом (***3c***);

– N-арахидоноилдофамин и его аналоги с некоторыми ненасыщенными кислотами ω6 (***1f*** дигомо-g-линоленовая, ***1e***а-диметиларахидоновая, ***1i*** пиноленовая) и ω3 (***1a*** докозагексаеновая, ***1b*** докозапентаеновая, ***1c*** эйкозапентаеновая, ***1g*** стеаридоновая, ***1h***а-линоленовая) серий. Амиды арахидоновой кислоты с родственными дофамину аминами: фенэтиламин (***5a***), фенилаланин (***5b***), тирамин (***5c***), тирозин (***5d***), L-ДОФА (***5f***), 3-метоксидофамин (***5g***), 4-метоксидофамин (***5h***), норадреналин (***5i***), адреналин (***5j***);

– N-арахидоноилсеротонин и его аналоги с рядом жирных кислот. Амиды арахидоновой кислоты с родственными серотонину (***4b***) аминами: триптофан (***4e***), триптамин (***4a***), 5-метокситриптамин (***4c***), 5-бромтриптамин (***4d***).

Синтетические аналоги применялись для сравнительной характеристики биологической активности, для выяснения роли структурных компонентов (жирной кислоты и соответствующего амина или спирта), а также для выявления более эффективных модуляторов активности нейролипинов. Кроме того, некоторые синтетические нейролипины могут рассматриваться как возможные эндогенные соединения с самостоятельным механизмом действия, либо как биосинтетические предшественники или метаболиты нейролипинов, а также как структурные компоненты гибридных лекарственных препаратов.

Работами последних лет установлено, что рецепторными мишенями эндогенных нейролипинов анандамида и 2-арахидоноилглицерина (2АГ) являются каннабиноидные рецепторы 1-го и 2-го типов (КР1 и КР2) и ванилоидные рецепторы 1-го типа (ВР1) (Pertwee, 2006). Взаимодействие N-арахидоноилдофамина (АДА), N-арахидоноилсеротонина (АСТ) и их аналогов с рецепторами нейролипинов опи-

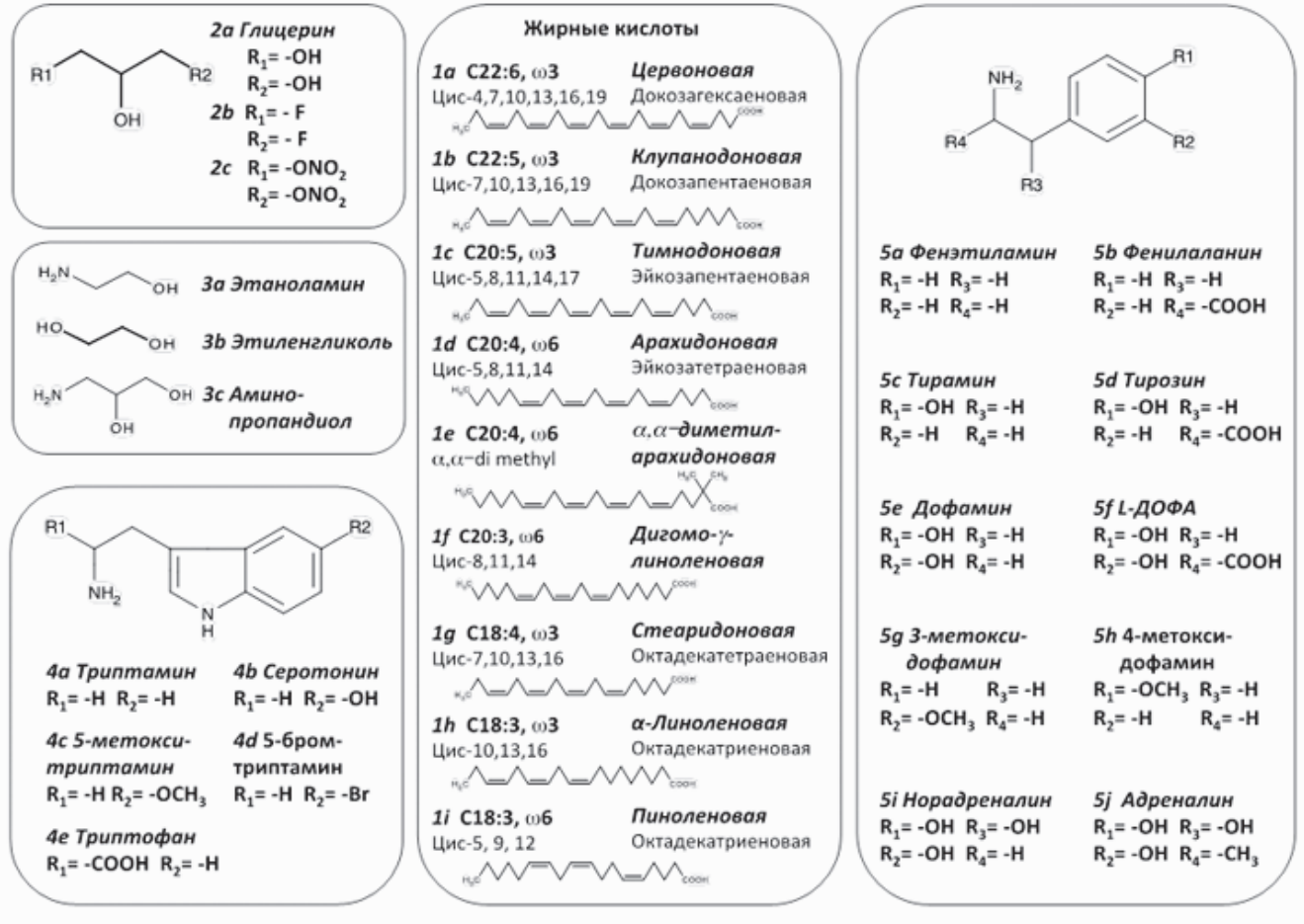


Рис. 1. Структуры нейролипинов и их аналогов (амидов $R_{ЖК}$-CO-NH-$R_{амин}$ и эфиров $R_{ЖК}$-CO-O-$R_{спирт}$ жирных кислот)

сано не было, поэтому на начальном этапе работы мы изучили свойства этих соединений как лигандов указанных рецепторных мишеней. Известным путем инактивации анандамида является его ферментативное расщепление до арахидоновой кислоты и этаноламина гидролазой амидов жирных кислот (ГАЖК) (Deutsch et al., 2002). Проведена оценка устойчивости АДА и АСТ к действию ГАЖК, а также были исследованы свойства представителей семейства N-ацилдофаминов и N-ацилсеротонинов как ингибиторов гидролиза анандамида. Соединения, содержащие гидрокси-группы в бензольном и индольном кольце, обладают антиоксидантными свойствами и способны восстанавливать радикалы различной природы (Stasiuk, Kozubek, 2010; Buemi et al., 2013). В то же время, антиоксидантный потенциал N-ацилдофаминов и N-ацилсеротонинов оставался не исследованным. Поэтому было важно изучить антиоксидантные свойства ацилированных производных дофамина и серотонина.

3. Нейролипины – лиганды каннабиноидных рецепторов

Взаимодействие с рецепторами оценивали методом радиолигандного связывания в препаратах плазматических мембран, полученных из клеток и тканей, содержащих соответствующие рецепторы. Для оценки взаимодействия изучаемых нейролипинов с каннабиноидным рецептором 1-го типа (КР1) использовали препараты мембран, выделенные из гомогената головного мозга крысы, а также синтетические радиоактивно меченые лиганды: агонист [^{3}H]CP55940 и антагонист [^{3}H] SR141716A. На начальном этапе с помощью насыщения рецепторного связывания определяли параметры взаимодействия (K_d) меченых лигандов с рецепторами, а затем проводили оценку связывания нейролипинов и их аналогов методом вытеснения радиоактивно меченых лигандов (Bezuglov et al., 2001; Bisogno et al., 2000; Bobrov et al., 2005; Lemak et al., 2007). Установлено, что наибольшим сродством к КР1 плазматических мембран головного мозга крысы обладают амиды жирных кислот. Анандамид (*1d-3a*) оказался наиболее эффективным лигандом (Ki=12 nM) среди эндогенных нейролипинов. Константа ингибирования для N-арахидоноилдофамина (АДА, *1d-5e*) составила 100 nM, тогда как N-арахидоноилсеротонин (АСТ, *1d-4b*) не проявлял значимой активности (Bisogno et al., 1998) (табл. 1).

Замены в жирнокислотной части молекулы АДА на ω3 кислоты с разной длинной алифатической цепи и степенью ненасыщенности приводили к снижению аффинности соответствующих аналогов (см. табл. 1). В семействе дофаминоидов активность соединений в зависимости от структуры жирнокислотного остатка убывала в следующем ряду (приведены обозначения жирных кислот):

C20:4ω6>C22:5ω3>C20:5ω3>C22:6ω3>C18:3ω6>>C18:4ω3>C18:3ω3>a-dm-C20:4ω6.

Работами ряда авторов было показано, что замены остатков арахидоновой кислоты в анандамиде и 2АГ на ω3 кислоты приводили к резкому падению аффинности соответствующих аналогов, значения констант ингибирования которых превышали 10 мкМ (Hillard, Campbell, 1997; Sugiura et al., 1999). Интересно, что у произ-

Таблица 1

Аффинность амидов жирных кислот на КР1 и их активность в каннабиноидной тетраде тестов на мышах

Амиды жирных кислот		КР1, Ki, нМ	Тетрада			
Жирная к-та	Амин		ОП	ИН	T°C	ГП
20:4ώ6 1d	дофамин 5e	100	++	55	1,7	++
22:5 ώ3 1b	дофамин 5e	425	++	73	1,8	+
20:5 ώ3 1c	дофамин 5e	475	++	78	1,6	+
22:6 ώ3 1a	дофамин 5e	500	++	68	1,8	+
18:3 ώ6 1i	дофамин 5e	1050	–	51	–	–
18:4 ώ3 1g	дофамин 5e	2000	+	68	1,7	–
18:3 ώ3 1h	дофамин 5e	2150	+	45	–	–
20:4 ώ6 1d	этаноламин 3a	12	++	70	2,5	++
20:4 ώ6 1d	аминопропандиол 3c	55	+	60	1,9	+
20:4 ώ6 1d	серотонин 4b	на	–	–	–	–
20:5ώ3 1c	серотонин 4b	нт	–	–	–	–
22:6ώ3 1a	серотонин 4b	нт	–	–	–	–

Ki – константы ингибирования связывания [^{3}H]CP55,940 в мембранах мозга, «на» – вытеснение менее 30% метки при концентрации 10 мкМ; нт – не тестировали. Тесты тетрады: ОП – «открытое поле»; ИН – индекс неподвижности в тесте «кольцо», в % (макс. 100%); TºC – падение ректальной температуры; ГП – горячая пластинка (пояснение см. в тексте). ++ – достоверно отличается от контроля в два и более раза; + – достоверно отличается от контроля менее чем в два раза; – – нет активности по сравнению с контролем (достоверные отличия $p<0,05$, тест Стьюдента).

водных дофамина с ω3 жирными кислотами не наблюдается драматических потерь аффинности, тогда как замена арахидоновой кислоты на кислоты С18-семейства независимо от серии (ω3 или ω6) привела к падению аффинности на порядок и более.

Для определения характера взаимодействия с рецептором были проведены исследования специфических для активации КР1 физиологических ответов в тестах на клетках и на животных. Известно, что под действием агонистов КР1 у мышей наблюдается снижение локомоторной активности, каталепсия, снижение ректальной температуры и повышение порога болевой чувствительности (Fride et al., 2006). Проявление всех перечисленных ответов под действием исследуемого вещества характеризует его как агонист КР1. Анандамид проявлял выраженную активность во всех тестах тетрады. N-ацилдофамины демонстрировали активность, согласующуюся с результатами экспериментов по связыванию: аналоги, имевшие низкую активность в отношении КР1, также менее эффективны в тетраде (см. табл. 1). Кроме того, было установлено, что N-ацилсеротонины не вызывают характерных для каннабиноидов ответов в проведенных тестах (Bezuglov et al., 2001; Bisogno et al., 1998).

Ранее было показано, что активация КР1, в частности анандамидом, стимулирует в клетках нейробластомы мыши N18TG2 повышение концентрации ионов Ca^{2+} за счет его выделения из внутриклеточных депо (Sugiura et al., 1997). Нами установлено, что в клетках линии N18TG2 анандамид и АДА стимулируют увеличение концентрации ионов Ca^{2+} внутри клетки. Причем АДА оказался в 45 раз более активным, чем анандамид (рис. 2). Предынкубация клеток с антагонистом КР1

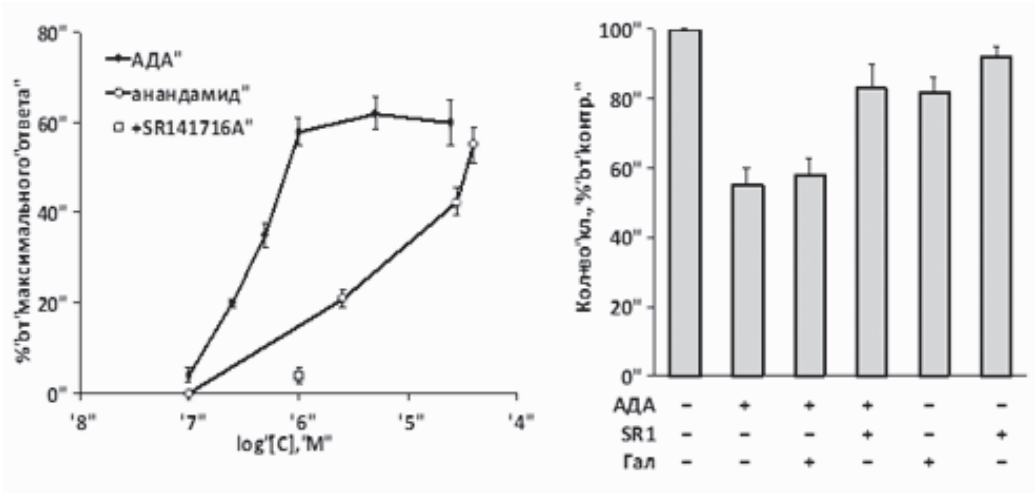


Рис. 2. Влияние АДА на клеточные ответы, опосредуемые КР1

А – изменение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в клетках нейробластомы N18TG2; максимальный ответ клеток фиксировался при добавлении 1 мМ $CaCl_2$; антагонист КР1 SR141716A (0,5 мкМ) был добавлен за 30 мин до АДА (1 мкМ); Б – ингибирование АДА (0,2 мкМ) пролиферации клеток линии MCF-7; SR1 – SR141716A (0,5 мкМ), Гал – галоперидол (0,1 мкМ)

SR141716A (0,5 мкм, 30 мин) приводила к исчезновению эффекта АДА (1 мкМ) (Bisogno et al., 2000). Еще одним характерным ответом на активацию КР1 является ингибирование пролиферации клеток линии рака молочной железы MCF-7 (Petrocellis et al., 1998). АДА ингибировал пролиферацию с EC_{50}=250 нМ, при этом антагонист КР1 SR141716A препятствовал ингибированию, тогда как неселективный антагонист дофаминовых рецепторов галоперидол не влиял на эффект АДА (см. рис. 2) (Bisogno et al., 2000).

Оценку взаимодействия N-ацилдофаминов с каннабиноидными рецепторами 2-го типа (КР2) проводили на препаратах плазматических мембран селезенки крысы, где ранее был обнаружен высокий уровень экспрессии этих рецепторов (Galiègue et al., 1995). В качестве меченого лиганда использовали [^{3}H]WIN-55,212-2. Было показано, что исследуемые соединения имеют низкую аффинность на КР2. Наиболее активным нейролипином из группы амидов жирных кислот оказался анандамид (Ki=3 мкМ). У производных дофамина значения констант ингибирования превышали 10 мкМ (Bisogno et al., 2000).

Ранее было установлено, что некоторые нейролипины (анандамид, 2АГ) способны реализовывать свои эффекты через ванилоидные рецепторы первого типа (ВР1, или TRPV1) (Smart et al., 2000; Zygmunt et al., 2013). АДА в диапазоне концентраций 0,5–25 мкМ не приводил к вытеснению селективного агониста ВР1 [^{3}H]-резинифератоксина в препаратах мембран спинного мозга крысы (Bisogno et al., 2000).

N-ацилдофамины имеют в своем составе остаток дофамина, что позволяет предположить их взаимодействие с дофаминовыми рецепторами. Однако оказалось, что на мембранных препаратах из мозга крысы АДА (0,1–10 мкМ) не приво-

дил к значимому вытеснению меченых лигандов D_1 и D_2 рецепторов, [^{3}H]SCH23390 и [^{3}H]-спиперона, соответственно (Bisogno et al., 2000).

Результаты, полученные в экспериментах по вытеснению меченного лиганда, во многом зависят от его структуры и места его связывания с рецептором, которое может не полностью соответствовать месту взаимодействия на рецепторе исследуемого соединения. Поэтому использование функциональных моделей может дать дополнительную информацию о сигнальных свойствах исследуемых веществ (см. далее). В данной работе, а также другими авторами было установлено, что ряд клеточных ответов, инициируемых АДА, ингибируется антагонистами BP1 и KP2 рецепторов (Sagar et al., 2004). Таким образом, нельзя исключать, что BP1 и KP2 также являются молекулярными мишенями N-ацилдофаминов.

Полученные результаты на клеточных моделях и в тестах на животных позволяют сделать вывод о том, что N-арахидоноилдофамин и некоторые его гомологи способны реализовывать свои эффекты за счет активации каннабиноидных рецепторов 1-го типа. Важно подчеркнуть, что в составе липидов головного мозга наблюдается повышенное содержание ω3 жирных кислот (Svennerholm, 1968), преимущественно докозагексаеновой кислоты (C22:6ω3, *1a*), которая, как и арахидоновая кислота, может служить предшественником эндогенных нейролипинов (Kim, Spector, 2013). Полученные нами результаты позволяют предположить, что в случае эндогенного образования N-ацилдофаминов, в состав которых входят ω3 кислоты, их молекулярными мишенями также могут быть каннабиноидные рецепторы 1-го типа.

4. Влияние ацилированных производных дофамина и серотонина на гидролиз анандамида

Известным способом регуляции действия нейролипинов из группы этаноламидов жирных кислот (например анандамида) является их деградация ГАЖК, экспрессируемой в тканях головного мозга (Deutsch et al., 2002). Устойчивость производных жирных кислот с дофамином и серотонином, а также взаимодействие этих соединений с ГАЖК практически не изучались.

Методом тонкослойной хроматографии нами было показано, что при инкубации анандамида с препаратами мембран головного мозга крысы в органических экстрактах смеси происходит повышение содержания свободной арахидоновой кислоты, что свидетельствует о гидролизе данных соединений. Использование ингибитора сериновых амидгидролаз фенилметилсульфонилфторида приводило к значительному снижению образования арахидоновой кислоты из анандамида. При инкубации АДА в тех же условиях обнаруживалось незначительное, по сравнению с анандамидом, количество арахидоновой кислоты. N-арахидоноилсеротонин (АСТ) был полностью устойчив к гидролизу. Анализ экстрактов с помощью ВЭЖХ также подтвердил стабильность АСТ в данных условиях. Был проведен анализ влияния АДА и АСТ, а также их производных на активность ГАЖК в препаратах мембран головного мозга крысы (Bisogno et al., 1998, 2000; Бобров и др., 2000; Безуглов и

др., 2006; Генрихс и др., 2010). В качестве субстрата использовали [^{3}H]-анандамид, меченный по остатку этаноламина (Рогов и др., 1997). Среди N-ацилдофаминов наибольшую ингибиторную активность проявлял N-эйкозапентаеноилдофамин (*1c-4b*), тогда как АДА был наименее активным. Таким образом, в этом тесте производные ω3 жирных кислот были активнее производных ω6 кислот (табл. 2).

Среди N-ацилсеротонинов наибольшей активностью обладали N-эйкозапетаеноил-серотонин (ЭСТ, *1c-4b*) и АСТ (*1d-4b*) с IC_{50} 1 мкМ и 5,2 мкМ, соответственно (табл. 3). По-видимому, молекулы, содержащие эйкозапентаеновую кислоту, имеют наиболее подходящую конформацию для взаимодействия с ферментом. Таким образом, замена арахидоновой кислоты в составе нейролипинов на ω3 жирные кислоты может приводить к усилению ингибирования ГАЖК.

Можно предположить, что остатки дофамина и серотонина в молекулах нейролипинов обеспечивают ингибирующее действие за счет гидроксильных групп

Таблица 2

Ингибирование ГАЖК N-ацил-дофаминами и их аналогами. Сопоставление с активностью этих соединений в отношении КР1

Соединения		ГАЖК IC_{50} мкМ	КР1, Ki, нМ
Жирная к-та	Амин		
20:4ω6 1d	тирозин 5d	>50	>10000
20:4ω6 1d	L-DOFA 5f	>50	>10000
20:4ω6 1d	тирамин 5c	16	102
20:4ω6 1d	дофамин 5e	24	100
20:4ω6 1d	норадреналин 5i	7,5	220
20:4ω6 1d	адреналин 5j	45	2500
20:4ω6 1d	6-гидроксидофамин	40	>10000
20:4ω6 1d	3-метоксидофамин 5g	40	310
20:4ω6 1d	4-метоксидофамин 5h	11,5	190
20:4ω6 1d	фенэтиламин 5a	33	200
20:5ω3 1c	дофамин 5e	3,8	475
18:4ω3 1g	дофамин 5e	5	2000
22:5ω3 1b	дофамин 5e	9	425
22:6ω3 1a	дофамин 5e	11	500
18:3ω3 1h	дофамин 5e	12	2150
α-dm-20:4ω6 1e	дофамин 5e	>50	10000

Таблица 3

Ингибирование ГАЖК N-ацил-серотонинами и их аналогами

Соединения		$IC_{50,}$ мкМ
Жирная кислота	Амин	
20:4ω6 1d	серотонин 4b	5,2
20:4ω6 1d	5-метокситриптамин 4c	6
20:4ω6 1d	триптамин 4a	7,5
20:4ω6 1d	5-бромтриптамин 4d	50
20:4ω6 1d	триптофан 4e	>100
20:5ω3 1c	серотонин 4b	1
18:3ω3 1h	серотонин 4b	7,5
C9	серотонин 4b	39

в ароматической части. Об этом свидетельствуют результаты по активности соединений, где эти группы отсутствовали или были замещены. Также наблюдалось значительное снижение активности у ацилированных производных аминокислот, которые являются предшественниками дофамина и серотонина: N-арахидоноилтирозина и N-арахидоноилтриптофана (см. табл. 2, 3).

Полученные данные дают основание заключить, что производные жирных кислот с дофамином и серотонином являются умеренными ингибиторами ГАЖК. Можно предположить, что повышение количества таких нейролипинов в результате их эндогенного выделения или поступления извне будет приводить к усилению физиологических ответов как за счет собственного взаимодействия с рецепторными мишенями, так и за счет торможения инактивации других нейролипинов, например анандамида.

5. Антиоксидантные свойства N-ацилдофаминов и N-ацилсеротонинов

Работами последних лет установлено, что соединения, содержащие гидроксильные группы в бензольном или индольном кольце, обладают антиоксидантными свойствами и способны восстанавливать радикалы различной природы (Stasiuk, Kozubek, 2010; Buemietal., 2013). В то же время, антиоксидантный потенциал N-ацилдофаминов и N-ацилсеротонинов оставался неисследованным.

Свойства представителей этих двух групп были изучены в тесте со стабильным органическим радикалом гальвиноксилом. Анализ активности соединений прово-

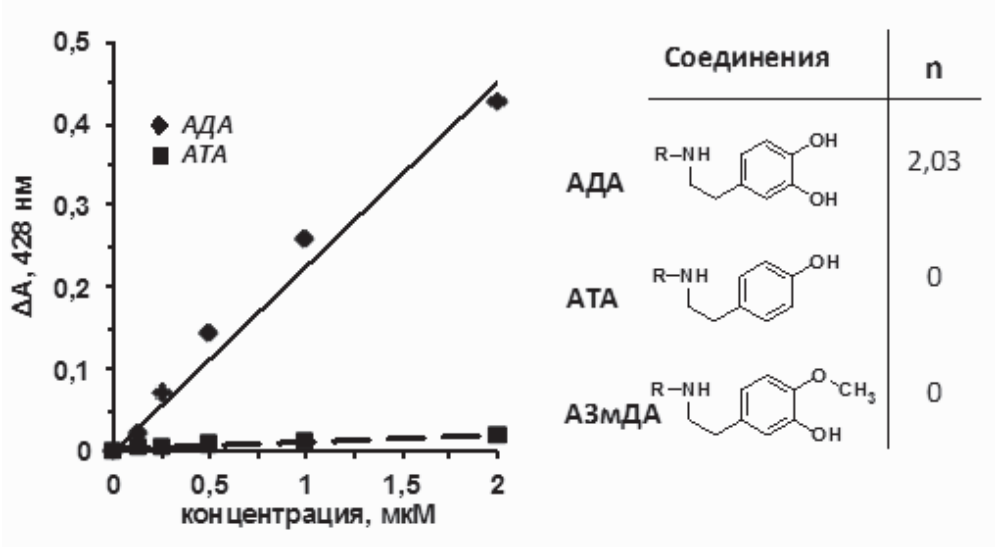


Рис. 3. Восстановление стабильного органического радикала гальвиноксила

На графике показано увеличение падения поглощения гальвиноксила в присутствии АДА. АТА – N-арахидоноилтирамин, АЗмДА – N-арахидоноил-3-метоксидофамин. n – стехиометрический коэффициент

дили при помощи фотометрического измерения поглощения радикальной формы гальвиноксила (10 мкМ) в абсолютном этаноле при λ=428 нм. При восстановлении гальвиноксила наблюдается падение поглощения, по которому можно рассчитать стехиометрический индекс (n), характеризующий количество восстановительных эквивалентов в молекуле исследуемого соединения, способных реагировать с радикалом.

$$n=\Delta A/\varepsilon lC,$$

где ΔA– величина падения поглощения, ε– коэффициент экстинкции гальвиноксила, C– концентрация антиоксиданта, l=1 см).

Было установлено, что N-ацилдофамины эффективно восстанавливают гальвиноксил, при этом активность соединений в данном тесте не зависит от структуры жирной кислоты, входящей в их состав. Стехиометрический индекс для исследованных N-ацилдофаминов был близок к значению 2, что свидетельствует о наличии двух восстановительных эквивалентов (рис. 3). При помощи аналогов АДА, содержащих модификации в катехольной группе, было установлено, что для проявления активности необходимо наличие двух гидроксильных групп, поскольку производные с тирамином (*1d-5c*), 3-метоксидофамином (*1d-5g*) и 4-метоксидофамином (*1d-5h*) были неактивны как восстановители гальвиноксила (Бобров и др., 2006; Bobrov et al., 2008). В присутствии АСТ также наблюдалось восстановление гальвиноксила, при этом амид арахидоновой кислоты с 5-метокситриптамином (*1d-6c*) был не активен, что свидетельствует об участии гидроксильной группы серотонина в реакции восстановления.

Полученные результаты позволяют предположить, что N-ацилдофамины и N-ацилсеротонины могут проявлять антиоксидантные свойства в условиях эндогенной продукции реактивных форм кислорода и образования органических радикалов. Это было подтверждено в экспериментах на культурах клеток (см. ниже).

6. Нейропротекторный потенциал представителей семейства нейролипинов

Нейрозащитное действие нейролипинов изучали на основе экспериментальных подходов, моделирующих патологические процессы при ишемии. На клеточных культурах нейронов различных отделов мозга животных были использованы модели гипоксии, глутаматной нейротоксичности, окислительного стресса и нейронального апоптоза (K^+-депривация). Исследованы возможные молекулярные механизмы нейрозащитного действия нейролипинов. Наиболее активные соединения были протестированы на животных в моделях гипоксии и фокальной ишемии. Была проведена оценка влияния нейролипинов на изменение ультраструктурных, гистологических и морфологических параметров, наблюдаемых при ишемии. Также изучено влияние нейролипинов на локальный мозговой кровоток и агрегацию тромбоцитов.

7. Влияние нейролипинов на нейрональный апоптоз

Модель калиевой депривации является одним из распространенных способов изучения нейронального апоптоза. Нейроны мозжечка крысы сохраняют жизнеспособность при культивировании в среде с повышенным содержанием ионов калия (25 мМ). При понижении концентрации калия до 5–10 мМ в течение 18–24 часов наблюдается массовая гибель нейронов по пути апоптоза (D'Mello et al., 1993). В данной модели были протестированы аналоги анандамида, 2АГ, АСТ и АДА. В исходной постановке опыта все вещества исследовали в трех концентрациях: 0.1, 1, 10 мкМ. Анандамид, 2АГ и АСТ, а также их аналоги в данном тесте оказались неактивны. Среди N-ацилдофаминов нейрозащитное действие проявили АДА и N-докозагексаеноилдофамин (ДДА, *1a-5e*). Максимальный эффект наблюдали при концентрации 10 мкМ: 59% и 39% выживших клеток для АДА и ДДА, соответственно. Для этих соединений было проведено исследование зависимости защитного эффекта от концентрации (рис. 4).

АДА увеличивал выживаемость нейронов в диапазоне концентраций 1–15 мкМ (30–65% выживших клеток), тогда как ДДА был активен в интервале 5–30 мкМ (10–85% выживших клеток). Применение антагонистов каннабиноидных, ванилоидных и дофаминовых рецепторов показало, что эффекты N-ацилдофаминов реализуются преимущественно за счет KP2 и BP1 (рис. 5). Аналоги АДА с модификациями в дофаминовой части не оказывали достоверного защитного действия (Генрихс и др., 2010а).

С учетом биохимических характеристик нейролипинов, описанных выше, нами была применена комбинация соединений, состоящая из нейролипина и ингибитора его гидролиза. Были использованы АДА и ДДА в комбинации с наиболее активным ингибитором ГАЖК N-эйкозапентаеноилсеротонином (ЭСТ, *1c-4b*).

Было установлено, что ЭСТ снижает эффективную концентрацию АДА и ДДА в условиях K^+-депривации. В присутствии АДА (5 мкМ) и ДДА (10 мкМ) выжива-

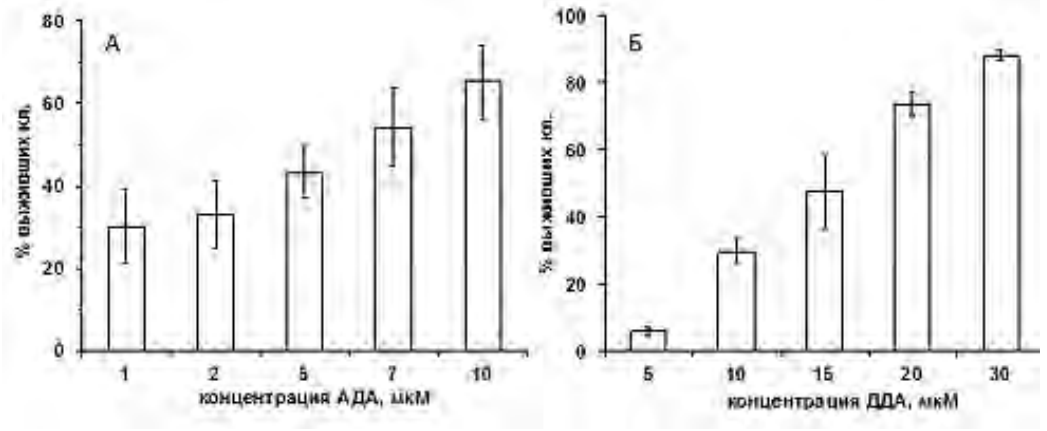


Рис. 4. Защитное действие АДА (А) и ДДА (Б) на нейроны мозжечка крысы в модели K^+-депривации: инкубация 18 ч в среде с пониженной концентрацией K^+ (9 мМ) в присутствии нейролипинов
Жизнеспособность определяли МТТ-тестом. $p<0,05$ – дисперсионный анализ

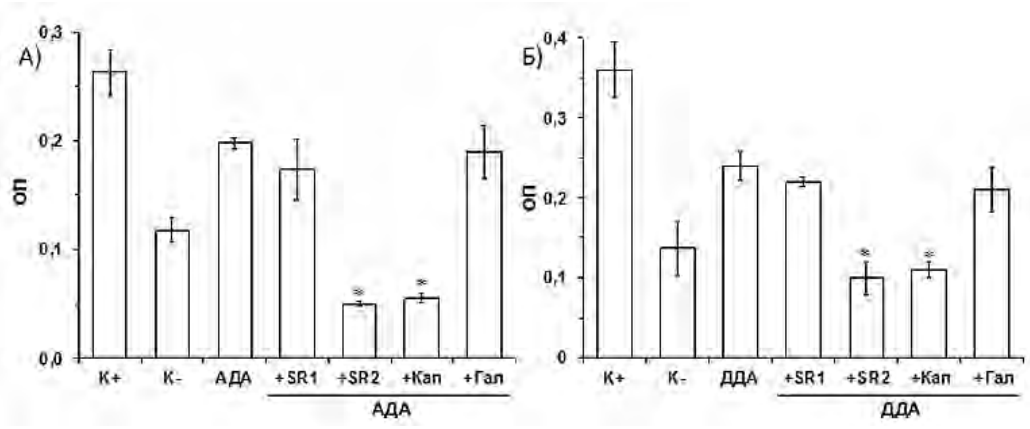


Рис. 5. Защитное действие АДА (А) и ДДА (Б) реализуется в модели K^+-депривации при участии КР2 и ВР1

К+ – контроль (25 мМ K^+), К– – АДА (9 мМK^+), ДДА (15 мкМ), SR1 – антагонист КР1 SR141716A (2,5 мкМ), SR2 – антагонист КР2 SR144528 (2,5 мкМ), Кап – антагонист ВР1 капсазепин (2,5 мкМ), Гал – галоперидол (1 мкМ), антагонист рецепторов дофамина. ОП – оптическая плотность в МТТ-тесте. $p<0,05$ в сравнении с АДА или ДДА

ние клеток повышалось на 30-40% по сравнению с контролем. На фоне повышающейся концентрации ЭСТ 1–10 мкМ наблюдали усиление нейропротекторного эффекта АДА и ДДА до 80–90% (рис. 6). Эффект комбинации ДДА+ЭСТ заметно уменьшался в присутствии антагониста КР2, тогда как антагонист КР1 на него не влиял (Генрихс и др., 2010б).

Характерными признаками развития апоптоза являются активация кальций-зависимых протеаз (каспаз) и фрагментация ядерной ДНК (Hou, MacManus, 2002).

Электрофоретический анализ ДНК, выделенной из клеток, показал, что при инкубации с АДА и ДДА количество фрагментов с характерной длиной 180 пар оснований заметно снижается по сравнению с контролем (данные не приведены).

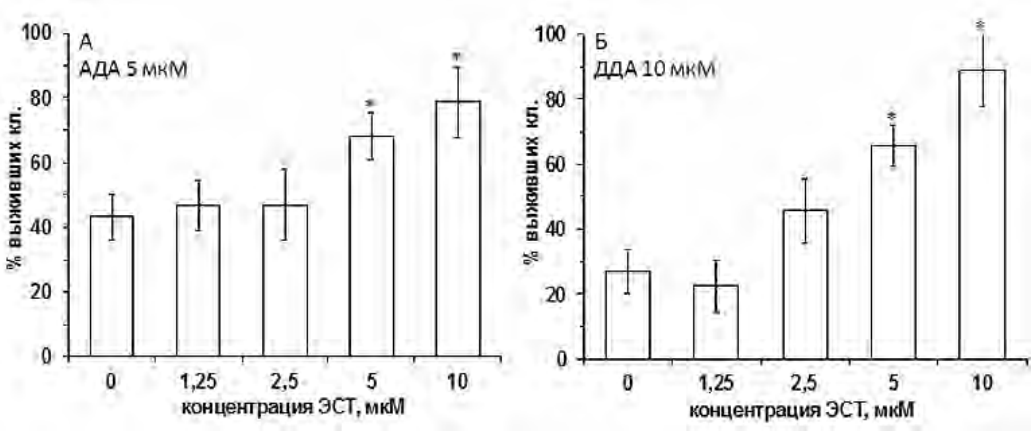


Рис. 6. Усиление защитного действия N-ацилдофаминов (АДА, ДДА) при K^+-депривации в комбинации с ингибитором ГАЖК N-эйкозапентаеноилсеротонином (ЭСТ)

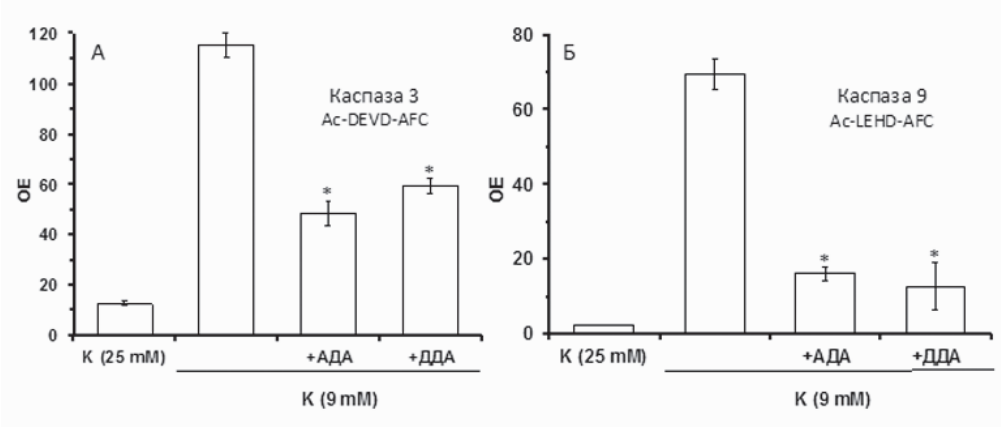


Рис. 7. Снижение активности каспаз 3 (А) и 9 (Б) под действием АДА и ДДА в условиях K^+-депривации

Для определения активности каспаз в клеточных препаратах использовали флуоресцентно меченые субстраты Ac-DEVD-AFC (каспаза 3) и Ac-LEHD- AFC (каспаза 9). ОЕ – относительные единицы флуоресценции. * $p<0,05$ в сравнении с контролем К (9 мМ)

Оценку активности каспаз 3 и 9 в культуре нейронов проводили с использованием флуоресцентно меченых субстратов. Было показано, что при K^+-депривации увеличивается активность обеих каспаз, что свидетельствует в пользу развития гибели нейронов по пути апоптоза в данной модели. В присутствии АДА и ДДА активность этих ферментов снижена в 4–5 раз (рис. 7), что служит подтверждением антиапоптотического действия этих соединений.

Для выяснения возможных путей внутриклеточной сигнализации, задействованных в защитном эффекте АДА и ДДА, проведен ингибиторный анализ ряда клеточных протеинкиназ. Для этого АДА и ДДА применяли в сочетании с ингибиторами фосфоинозитол-3-киназы (PI3K), протеинкиназы А (PkA), протеинкиназы С (PkC), кальций-кальмодулин-зависимой киназы 2-го типа (CaMK-II), киназ, активируемых внеклеточными сигналами (MEKK, MEK-1,2). В присутствии ингибиторов PI3K, PkC и CaMK-II наблюдали выраженное снижение нейропротекторного действия АДА и ДДА, что может свидетельствовать в пользу участия этих протеинкиназ во внутриклеточных каскадах, приводящих к повышению жизнеспособности нейронов под действием этих нейролипинов (рис. 8).

8. Влияние нейролипинов на жизнеспособность и функционирование нейронов на модели глутаматной нейротоксичности (ГНТ)

Нейрозащитные свойства нейролипинов изучены нами на модели ГНТ на первичных культурах нейронов коры головного мозга крыс или мышей. Нейроны коры мозга мыши подвергались кратковременному (15–20 мин) воздействию токсических количеств глутамата (200 мкМ), после чего глутамат удаляли и клетки инкуби-

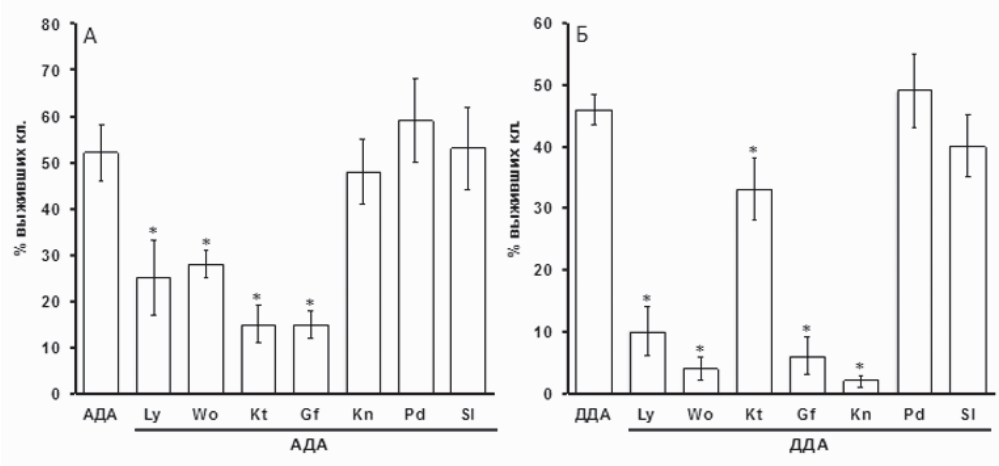


Рис. 8. Влияние ингибиторов киназ на защитное действие АДА и ДДА в модели K^+– депривации АДА (5 мкМ), ДДА (15 мкМ), ингибиторы киназ: Ly – LY294002 2 мкМ (PI3K), Wo – wortmanin 10 нМ (PI3K), Kt – KT-5720 1 мкМ (PKA), Gf – GF109203X 1 мкМ (PKC), Kn – KN62 1 мкМ (CaMKII), Pd – PD98059 1 мкМ (MEKK), Sl – SL327 1 мкМ (MEK 1,2). * $p<0,05$ в сравнении с эффектом АДА или ДДА

ровали с нейролипинами в течение 16–20 часов. Анандамид оказался неактивным в данном тесте, тогда как 2АГ обеспечивал снижение гибели клеток на 50% при концентрации 10 мкМ.

В отличие от модели K^+-депривации, в модели ГНТ АДА и ДДА проявляли сходное защитное действие в одинаковом диапазоне концентраций. Максимальный эффект достигал 75–78% выживших клеток при концентрации 10 мкМ для обоих соединений (рис. 9А). В данной модели также была использована комбинация АДА с ЭСТ. Концентрация АДА составляла 2,5 мкМ, при этой концентрации защитный эффект составил 26%, тогда как в сочетании с ЭСТ (2,5 и 5 мкМ) он достигал 48% (рис. 9Б).

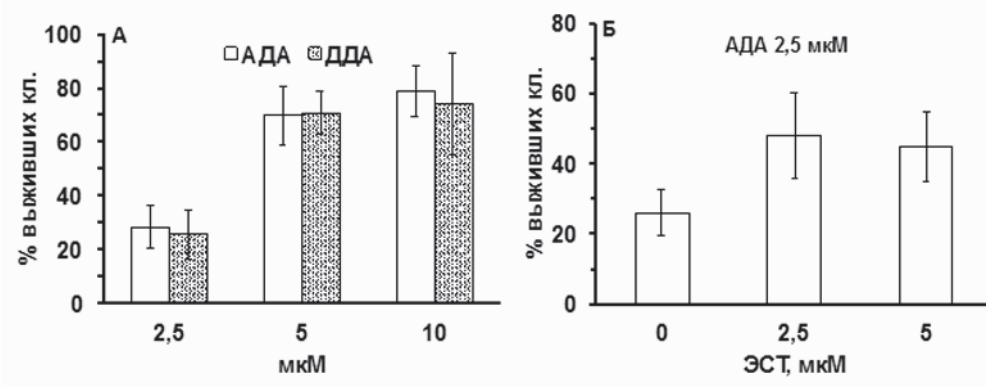


Рис. 9. А – защитный эффект АДА и ДДА в модели ГНТ в культуре нейронов коры мозга мыши. Б – потенцирование ЭСТ защитного действия АДА в модели ГНТ. Глутамат 200 мкМ, 15 мин, далее инкубация с веществами 16–20 часов, жизнеспособность определяли МТТ-тестом

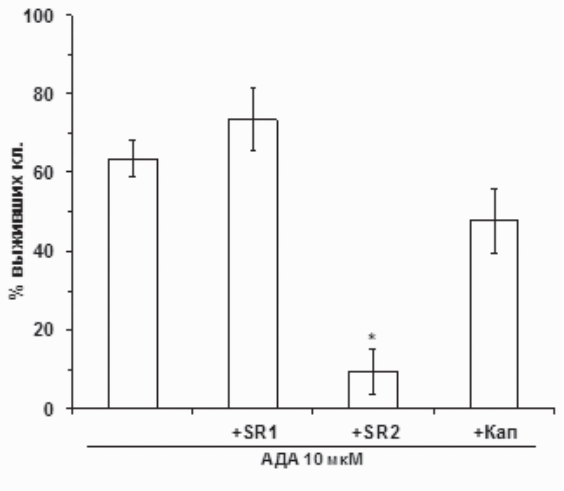


Рис. 10. Влияние антагонистов КР1, КР2 и ВР1 на защитный эффект АДА в модели глутаматной токсичности

+SR1 – SR141716A (КР1), +SR2 – SR144528 (КР2), +Кап – капсазепин (ВР1), все 5 мкМ. *$p<0,01$ в сравнениис АДА

АДА также защищал культивируемые нейроны мозжечка крысы от токсического действия глутамата. Нейропротекторное действие в данных условиях снижалось в присутствии антагониста КР2, тогда как антагонист КР1 не влиял на защитный эффект АДА (рис. 10). Антагонист ВР1 капсазепин также снижал количество выживших нейронов, обработанных АДА, однако эффект был менее выраженным.

Исследовано также влияние АДА на функциональные нарушения, индуцированные глутаматом в культуре нейронов гиппокампа крысы (Khaspekov et al., 2011). Для этого нейроны гиппокампа культивировали на мультиэлектродной матрице и регистрировали внеклеточные потенциалы с помощью системы MED64 (Alpha Med Scientific, Япония). После 10-го дня культивирования нейроны гиппокампа образуют функциональную сеть, о чем свидетельствует периодическая биоэлектрическая активность, которая характеризуется повторяющимися пачками внеклеточных потенциалов (ВП), регистрируемых на электродах матрицы. Под воздействием возрастающей концентрации глутамата количество пачек импульсов увеличивается, тогда как количество ВП уменьшается (рис. 11А). При этом сразу после добавления глутамата на всех электродах наблюдается период молчания (рис. 11В), длительность которого зависит от концентрации аминокислоты. АДА в диапазоне концентраций 0,5–5 мкМ не изменяет количества пачек и ВП, однако при концентрациях 7 и 10 мкМ количество пачек не меняется, тогда как количество ВП снижается (рис. 11Б). Комбинированное применение глутамата (50 мкМ) и АДА (10 мкМ) приводило к укорочению периода молчания в 3 раза, при этом наблюдалось восстановление параметров сетевой пачечной активности (рис. 11В,Г). Полученные данные свидетельствуют о том, что N-ацилдофамины повышают жизнеспособность нейронов после токсического действия глутамата, а также могут восстанавливать функциональные свойства нейронов в культуре.

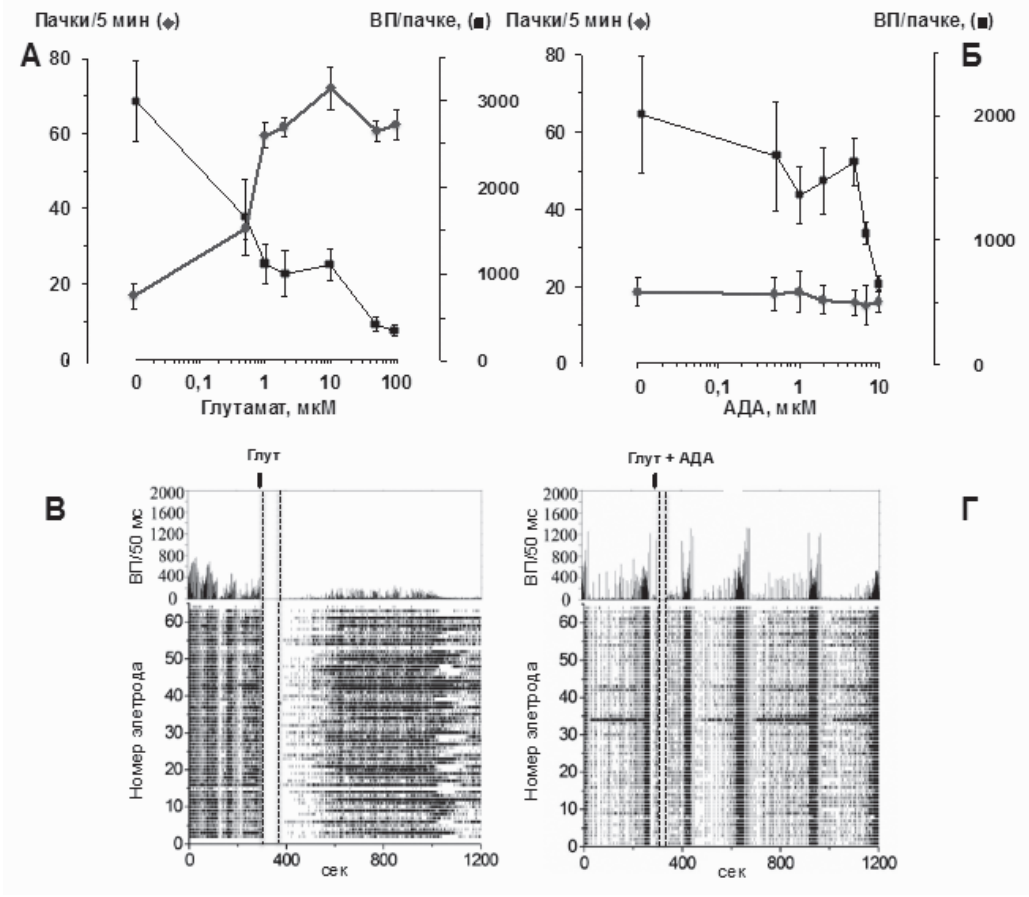


Рис. 11. Действие глутамата, АДА и их комбинации на биоэлектрическую сетевую активность нейронов гиппокампа в диссоциированной культуре

А, Б – влияние глутамата и АДА на параметры сетевой активности: количество сетевых пачек за 5 минут регистрации и количество внеклеточных потенциалов в малой сетевой пачке. В, Г – растровые диаграммы сетевой активности по действием глутамата (50 мкМ) и в комбинации с АДА (10 мкМ). Стрелками обозначен момент добавления веществ, пунктирными линиями выделен период молчания (отсутствие сетевой активности)

9. Защитное действие нейролипинов при гипоксии

Влияние нейролипинов на жизнеспособность нейронов в условиях гипоксии изучали на культурах нейронов новой коры и гиппокампа головного мозга крысы. Нейроны коры помещали на 4 часа в камеру, продуваемую смесью азот/углекислота (95/5%), после чего инкубировали 16 часов в нормальной атмосфере. В данных условиях наблюдалось увеличение гибели нейронов в 1,5–1,6 раза по сравнению с культурами, находившимися в условиях нормоксии, о чем свидетельствовало соответствующее повышение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в среде инкубации. В данных условиях все исследованные нейролипины анандамид, 2АГ, АД, ДД) проявили защитное действие (рис. 12). Важно отметить, что эффект наблюдался при более низких концентрациях соединений (0,01–1 мкМ) по сравнению с другими моделями (Bobrov et al., 2005).

Воздействие гипоксии на жизнеспособность и функциональные свойства нейронов также изучали на клетках, выделенных из гиппокампа крысы и культивируемых на мультиэлектродных матрицах. Выживаемость определяли подсчетом живых и погибших клеток при помощи микроскопии после соответствующего окрашивания. Функциональную активность нейронов определяли регистрацией внеклеточных потенциалов на электродах мультиэлектродной матрицы (Ведунова и др., 2013).

Влияние нейролипинов и их рецепторов на указанные параметры оценивали на примере АДА. Было установлено, что через сутки после короткой гипоксии (10 мин в атмосфере аргона) во всех исследованных группах наблюдалось снижение жизнеспособности нейронов в среднем на 15%. На седьмые сутки после гипоксии жизнеспособность нейронов в контрольной группе снизилась до 30,8%, тогда как на фоне АДА (10 мкМ) количество живых клеток не изменилось по сравнению с первыми сутками после гипоксии. Антагонисты КР1 и ВР1 снижали защитное действие АДА (табл. 4).

АДА (10 мкМ); SR1 – антагонист КР1 SR141716A (2,5 мкМ); SR2 – антагонист КР2 SR144528 (2,5 мкМ); Кап – антагонист ВР1 капсазепин (2,5 мкМ); * $p<0,05$ сравнение с нормоксией, ** $p<0,05$ сравнение с 1-ми сутками после гипоксии тест Стьюдента

В культурах нейронов гиппокампа, подвергнутых гипоксии, также наблюдалось изменение характера спонтанной сетевой активности. В контрольных культурах происходило увеличение среднего количества сетевых пачек через 10 минут после гипоксии (рис. 13А). Количество внеклеточных потенциалов (ВП) в пачке оставалось при этом неизменным (рис. 13Б). Количество пачек снижалось через 2 часа и через сутки после гипоксии, а на 7-е сутки наблюдалось практически полное прекращение пачечной активности. Также отмечалось снижение количества ВП в пачке после гипоксии на первые и седьмые сутки. Аппликация АДА (10 мкМ) препятствовала развитию изменений, наблюдаемых в контроле, и приводила к сохранению структуры пачечной активности сети в первые сутки постгипоксического периода (см. рис. 13А). Важно отметить, что использование АДА приводило к сохранению жизнеспособности клеток на 7-е сутки на уровне первых суток после гипоксии (см. табл. 4). Таким образом, наблюдаемое снижение биоэлектрической

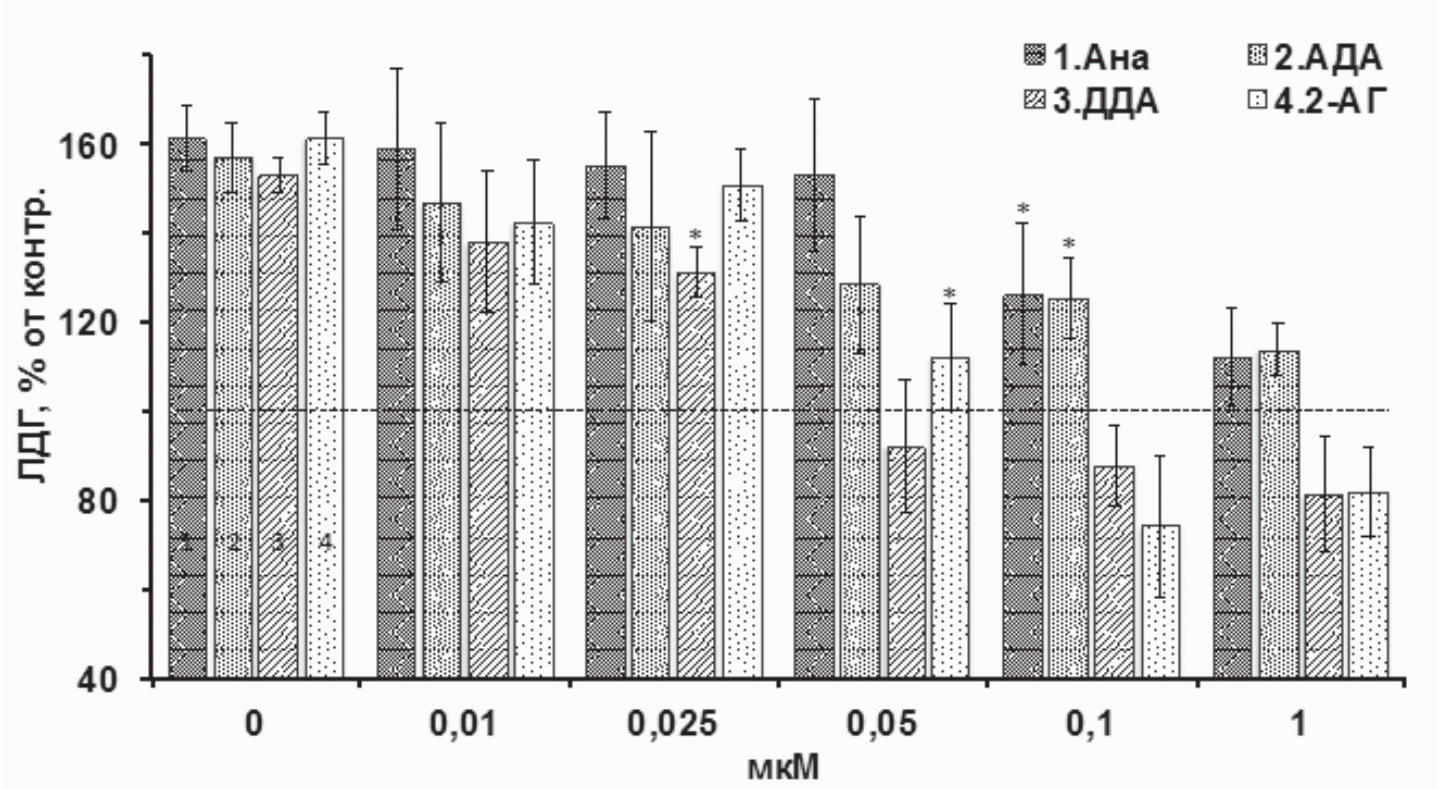


Рис. 12. Защита нейролипинами нейронов коры мозга крысы в условиях гипоксии

Нейроны инкубировали 4 ч в атмосфере N_2/CO_2 (95/5%) в среде, содержащей глюкозу, затем культуры переводили в условия нормоксии на 16 ч. Гибель нейронов определяли по активности ЛДГ в инкубационной среде. Пунктирной линией отмечена активность ЛДГ в интактных культурах, принятая за 100%. $p<0,05$ дисперсионный анализ; *$p<0,05$ Dunnett-тест

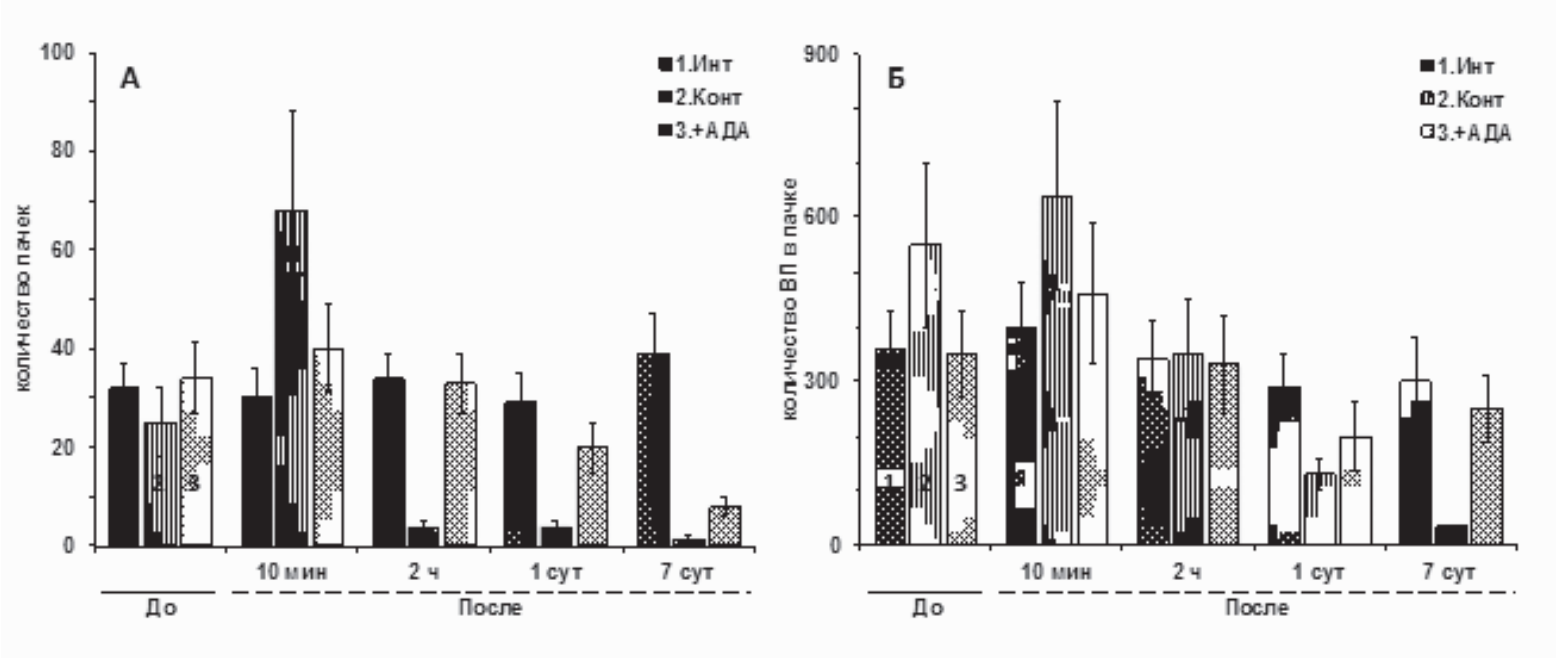


Рис. 13. Влияние АДА на спонтанную сетевую активность нейронов гиппокампа, подвергнутых гипоксии

Изменение количества сетевых пачек (А) и количества внеклеточных потенциалов (ВП) в пачке (Б) проводили до и после (через 10 мин, 2 ч, 1 и 7 суток) гипоксии. Инт. – интактная культура; Конт. – культура, подвергнутая гипоксии (10 мин); +АДА – культура, подвергнутая гипоксии (10 мин) в присутствии АДА 10 мкМ

Таблица 4

Выживаемость нейронов гиппокампа после гипоксии

Группы	Живые клетки (%)	
	1-е сутки	7-е сутки
Нормоксия	89,4±1,3	89,0±2,1
Гипоксия	73,2±3,9*	30,8±4,8**
Гипоксия АДА	75,1±3,7*	75,2±10,4
Гипоксия АДА+SR1	75,5±1,4*	34,9±4,1**
Гипоксия АДА+SR2	73,9±3,9*	70,1±10,1
Гипоксия АДА+Kan	74,1±3,1*	42,1±10,4**

АДА (10 мкМ); SR1 – антагонист КР1 SR141716A (2,5 мкМ); SR2 – антагонист КР2 SR144528 (2,5 мкМ); Кап – антагонист ВР1 капсазепин (2,5 мкМ); * $p<0,05$, сравнение с нормоксией, ** $p<0,05$, сравнение с 1-ми сутками после гипоксии, тест Стьюдента/

активности на фоне АДА связано с функциональными изменениями, а не со снижением количества живых клеток, как в контрольных культурах.

Для выявления рецепторного компонента в реализации эффектов АДА были использованы антагонисты КР1-, КР2- и ВР1-рецепторов. Блокада КР1-рецепторов на фоне действия АДА приводила к снижению количества пачек через сутки после гипоксии (рис. 14А). Также наблюдалось выраженное увеличение (примерно в 8 раз) количества ВП в пачке, что свидетельствует о растормаживании сети за счет блокады КР1 рецепторов (рис. 14Б). На 7-е сутки после гипоксии при блокаде КР1 происходило полное исчезновение сетевой активности. При блокаде ВР1 на 1-е и 7-е сутки количество пачек уменьшалось, тогда как число ВП в пачке оставалось на том же уровне, что и у АДА. При блокаде КР2-рецепторов не происходило досто-

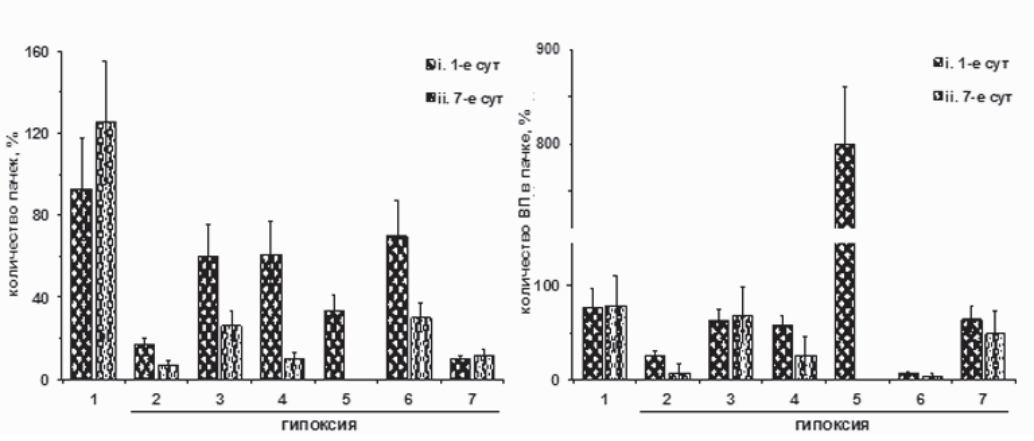


Рис. 14. Влияние антагонистов КР1, КР2 и ВР1 на вызванные АДА изменения спонтанной сетевой активности нейронов гиппокампа после гипоксии (через 1 и 7 суток)

На рисунках показано изменение количества сетевых пачек импульсов и внеклеточных потенциалов в пачке, выраженное в процентах от исходных значений, зарегистрированных до гипоксии. 1– интактный контроль; 2 – контроль гипоксия; 3 – АДА 10 мкМ; 4 – АДА 2,5 мкМ; 5 – АДА 2,5 мкМ + антагонист КР1 SR141716A 1 мкМ; 6 – АДА 2,5 мкМ + антагонист КР2 SR144528 1 мкМ; 7 – АДА 2,5 мкМ + антагонист ВР1 капсазепин 1 мкМ

верных изменений количества пачек на 1-е и 7-е сутки по сравнению с действием АДА, при этом количество ВП в пачке резко снижалось на 1-е сутки и оставалось далее неизменным (см. рис. 14А,Б).

Важно отметить, что блокада КР1- и ВР1-рецепторов снижает защитное действие АДА на 7-е сутки (см. табл. 4). Таким образом изменение биоэлектрической активности на 7-е сутки в присутствии антагонистов КР1 и ВР1 также может быть связано с уменьшением количества жизнеспособных нейронов. Полученные данные свидетельствуют о том, что АДА обладает выраженным нейропротекторным действием в условиях гипоксии, а также способствует сохранению функционального состояния нейронов гиппокампа в постгипоксический период. На регуляцию сетевой активности в постгипоксический период наиболее заметное влияние оказывают КР1-рецепторы. Тем не менее, общее влияние АДА на биоэлектрическую активность и выживаемость культивируемых клеток гиппокампа, по-видимому, является результатом тонкой настройки сетевой активности в результате суммарного взаимодействия со всеми тремя типами рецепторов.

10. Роль КР1 в процессах синаптической пластичности

Данные по растормаживанию сетевой активности нейронов гиппокампа при блокаде КР1, полученные в наших экспериментах, согласуются с результатами исследований последних лет, свидетельствующими об активном участии КР1 в регуляции синаптической трансмиссии, в частности – за счет пресинаптического торможения выброса нейромедиаторов (Castillo et al., 2012). Регуляция синаптической передачи имеет большое значение для сохранения морфофукционального состояния синапсов, особенно при дисрегуляции функции возбуждающего нейротрансмиттера глутамата при ишемии. Для выявления роли КР1 в процессах синаптической пластичности были изучены ультраструктурные изменения синаптических контактов в органотипических эксплантатах гиппокампа, подвергнутых длительной фармакологической блокаде КР1 (Фрумкина и др., 2007; Toni et al., 1999).

Установлено, что устранение регуляторного влияния КР1 антагонистом SR141716A приводит к значительной ультраструктурной реорганизации нейропиля (рис. 15), что проявлялось в появлении многочисленных удлиненных перфорированных (5–6 перфораций) синаптических соединений, в состав которых входили контакты различных типов: десмосомоподобные контакты (puncta adhaerentia), авезикулярные переходные зоны и синаптически активные зоны. Кроме этого наблюдали появление конвергентных и дивергентных синапсов, а также сегментированных контактов. Результаты исследований последних лет свидетельствуют о том, что подобные изменения происходят при усиленной стимуляции синаптических входов, в частности, при индукции длительной посттетанической потенциации в пирамидных нейронах поля СА1 гиппокампа, и указывают на повышение эффективности синаптической передачи, обусловленное возможностью дополнительного выброса нейромедиатора в каждом сегменте перфораций (Toni et al., 1999; Edwards, 1995). То же самое происходит и в срезах гиппокампа мышей с генетической

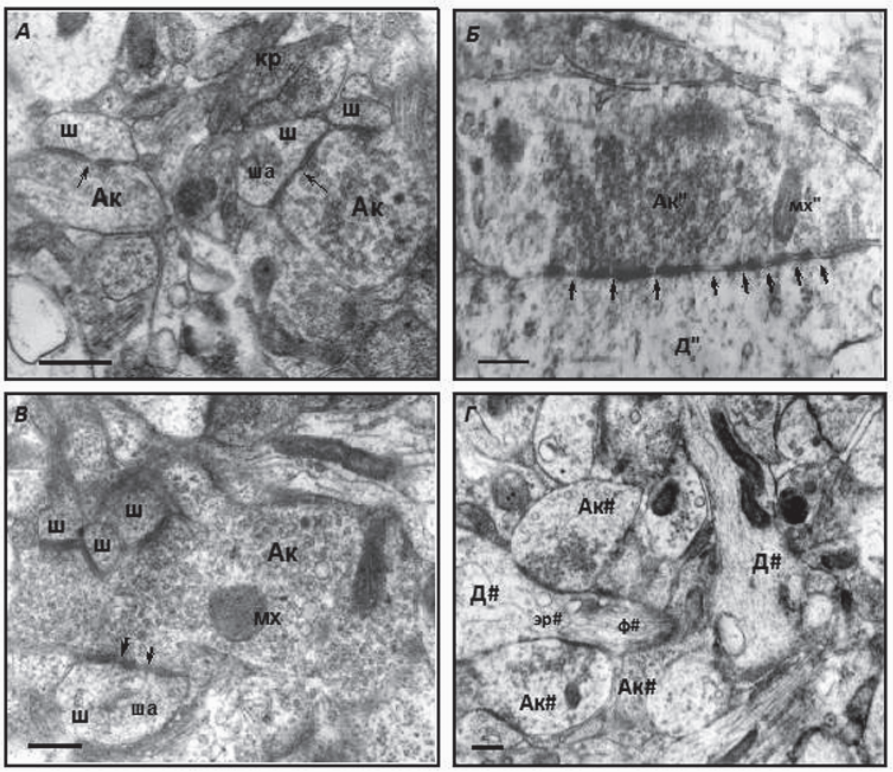


Рис. 15. Ультраструктурные перестройки синаптических контактов в органотипических эксплантатах гиппокампа крысы при блокаде КР1

Блокаду проводили добавлением антагониста КР1 SR141716A (5 мкМ) при смене сред каждые 2–3 дня в течение 14 дней. *А* – структура нейропиля радиального слоя поля СА1 гиппокампа в норме (14 дней в культуре). *Б* – перфорированные аксо-дендритные синапсы (стрелки) при блокаде КР1. *В, Г* – формирование сложных синаптических комплексов при блокаде КР1: дивергентного типа – контакты одного аксона на нескольких шипиках (*В*) и конвергентного типа – контакты нескольких аксонов на одной дендритной филоподии (*Г*). Ак – аксон; Д – дендрит; кр – конус роста; мх – митохондрия; ш – шипик; ша – шипиковый аппарат; ф – филоподия; эр – гладкий эндоплазматический ретикулум; длина черты соответствует 0,5 мкм

блокадой КР1, в которых ультраструктура синапсов также подвергается значительным пластическим перестройкам (Фрумкина и др., 2007). Кроме того, как при фармакологической, так и при генетической блокаде КР1 обнаружена повышенная подверженность нейронов гиппокампа *in vitro* цитотоксическому действию агонистов глутаматных рецепторов (Marsicano et al., 2003).

Таким образом, результаты наших исследований в сопоставлении с данными, полученными другими авторами, свидетельствует о том, что модулирующее влияние КР1 и их агонистов на синаптическую передачу является одним из механизмов, обеспечивающих стабильное морфофункциональное состояние синапсов и способствующих их сохранению при нарушениях регуляции нейромедиаторных процессов.

11. Защитное действие нейролипинов при окислительном стрессе

Выявление нами антиоксидантных свойств АДА, ДДА и АСТ явилось основанием для проверки защитного действия этих соединений в модели окислительного стресса. Гранулярные нейроны мозжечка крысы инкубировали в присутствии перекиси водорода (100 мкМ) в течение 24 часов. В этих условиях наблюдали снижение количества жизнеспособных нейронов до 20-30% от интактного контроля. Добавление АДА, ДДА и АСТ (0,1; 1; 10 мкМ) в инкубационные среды приводило к увеличению количества выживших клеток, при этом антагонисты КР1, КР2 и ВР1 не влияли на выживаемость нейронов в данных условиях. Максимальный эффект соединений наблюдался при концентрации 10 мкМ (рис 16А). Природный антиоксидант α-токоферол в том же диапазоне концентраций не оказывал защитного действия (Бобров и др., 2006; Bobrov et al., 2008).

Для подтверждения антиоксидантных свойств нейролипинов, был проведен анализ суммарного количества гидроперекисей в экстрактах клеток, подвергнутых окислительному стрессу (Bobrov et al, 2008). Количество гидроперекисей определяли в тесте с ксиленоловым оранжевым (Gay, Gebicki, 2002). После трех часов инкубации с H_2O_2 количество гидроперекисей в клеточных экстрактах увеличивалось в полтора раза, тогда как в присутствии АДА, ДДА и АСТ подобных изменений не отмечалось (рис 16Б).

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что производные жирных кислот с дофамином и серотонином могут являться частью эндогенной антиоксидантной системы в условиях чрезмерного образования органических гидроперекисей.

Подводя итог данной части работы, можно констатировать, что нейролипины способны оказывать защитное действие в условиях, моделирующих различные

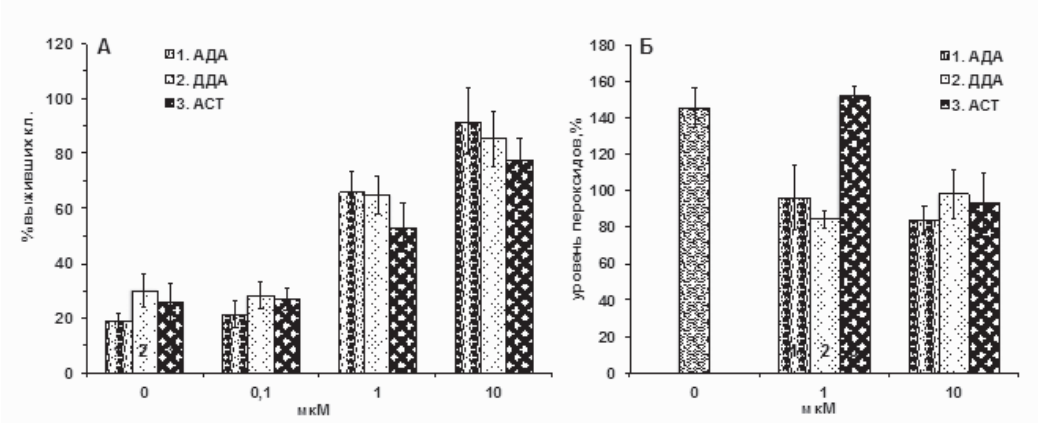


Рис. 16. Защитное действие АДА, ДДА и АСТ в модели окислительного стресса

А – гранулярные нейроны мозжечка крысы инкубировали с H_2O_2 (100 мкМ, 24 ч) в присутствии антиоксидантов; Б – снижение количества гидроперекисей в клеточных экстрактах нейронов мозжечка крысы, подвергшихся воздействию H_2O_2 (100 мкМ, 3 ч)

этапы ишемического процесса. Тем не менее, не все представители нейролипинов проявляли одинаковую эффективность. Так, анандамид и 2АГ защищали нейроны в условиях гипоксии и глутаматной токсичности, но были неактивны в модели нейронального апоптоза и окислительного стресса. Среди нейролипинов только N-ацидофамины АДА и ДДА защищали нейроны различных отделов головного мозга во всех тестах. Принимая во внимание тот факт, что N-ацилдофамины оказались наиболее активными в моделях *in vitro*, а также отсутствие данных по нейропротекторному потенциалу этих соединений *in vivo*, следующим этапом явилось изучение влияния представителей группы N-ацилдофаминов в моделях ишемического повреждения мозга на животных.

12. Эффекты N-арахидоноилдофамина при гипоксии *in vivo*

Для моделирования гипоксии использовали вакуумную проточную барокамеру, в которой мыши находились в условиях, соответствующих подъему на высоту 10–10,5 км. Одним из параметров устойчивости животных к гипоксии является время жизни на высоте. Предварительное введение АДА за 45 минут до моделирования гипоксии (2,5 и 10 мг/кг) достоверно увеличивало этот параметр (рис. 17А). Максимальный эффект отмечался в дозе 2,5 мг/кг. Также было зафиксировано увеличение выживаемости животных во время сеанса гипоксии (Митрошина и др., 2012). Максимальный эффект отмечен при использовании дозы 10 мг/кг: выживаемость животных повышалась в 2 раза и достигала 63% (рис. 17Б).

Функциональную активность головного мозга в постгипоксический период оценивали по сохранению долговременной памяти животных в водном лабиринте Морриса через сутки после моделирования гипоксии (Митрошина и др., 2012). Для

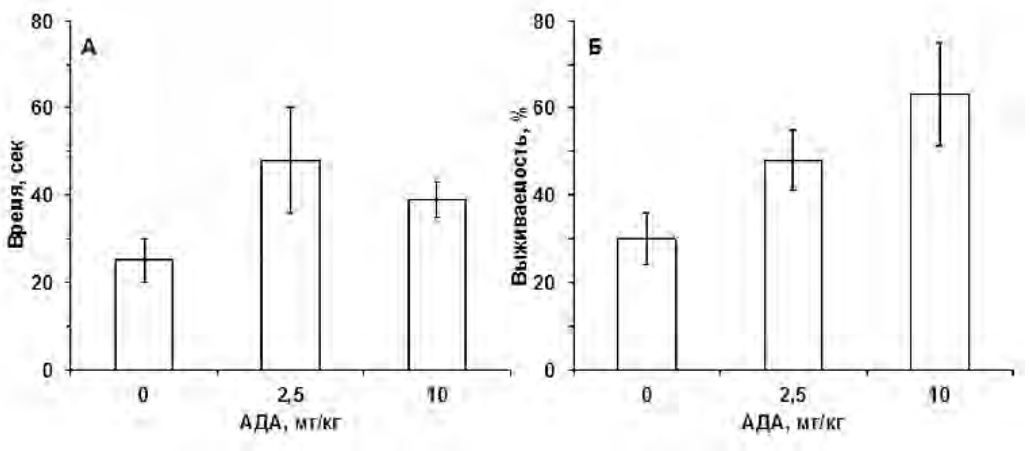


Рис. 17. Влияние АДА на параметры выживаемости у мышей, подвергнутых гипоксии

А – изменение времени жизни на высоте в период острой гипоксии. Б – выживаемость животных после острой гипоксии

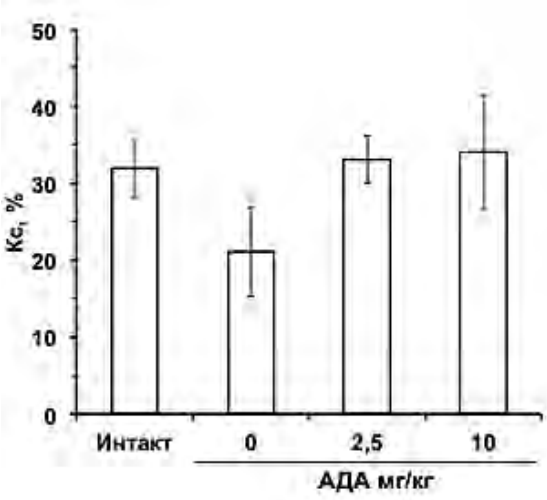


Рис. 18. Влияние АДА на параметры сохранения долговременной памяти у мышей в тесте Морриса после гипоксии

оценки изменений долговременной памяти был использован коэффициент сохранения ($К_С$), который рассчитывался как отношение времени пребывания животного в секторе бассейна, где находилась платформа, к общему времени пребывания животного в водном лабиринте. Гипоксия оказывала негативное влияние на сохранение долговременной памяти: $К_С$ в контрольной группе был заметно ниже, чем у интактных животных (рис. 18).

Применение АДА сохраняло долговременную память после обучения на уровне интактных животных. Действие АДА проявлялось в обеих использованных дозах: 2,5 мг/кг и 10 мг/кг. Антагонисты КР1, КР2 и ВР1 не влияли на эффекты АДА в данном тесте. Таким образом, нами было показано, что АДА обладает нейропротекторным действием, и позволяет предотвращать когнитивные нарушения у животных после гипоксического воздействия.

13. Защитное действие N-ацилдофаминов при фокальной ишемии

В результате фототромбоза поверхностных сосудов коры теменной доли головного мозга у крыс на 4-е сутки развивался ишемический очаг, в котором наблюдался выраженный участок некротического повреждения, окруженный зоной полутени. Введение АДА или ДДА (оба 5 мг/кг) в течение 4 суток после инсульта приводило к снижению объема очага некротического повреждения (рис. 19А,Б). Наибольший защитный эффект демонстрировал ДДА, который уменьшал очаг повреждения на 49% по сравнению с контролем. С учетом данных, полученных на моделях *in vitro*, об эффективности использования N-ацилдофаминов совместно с N-эйкозапентаеноилсеротонином (ЭСТ), нами был применен тот же подход в условиях фокальной ишемии (Генрихс и др., 2010а). Так, комбинация ДДА (2,5 мг/кг) и

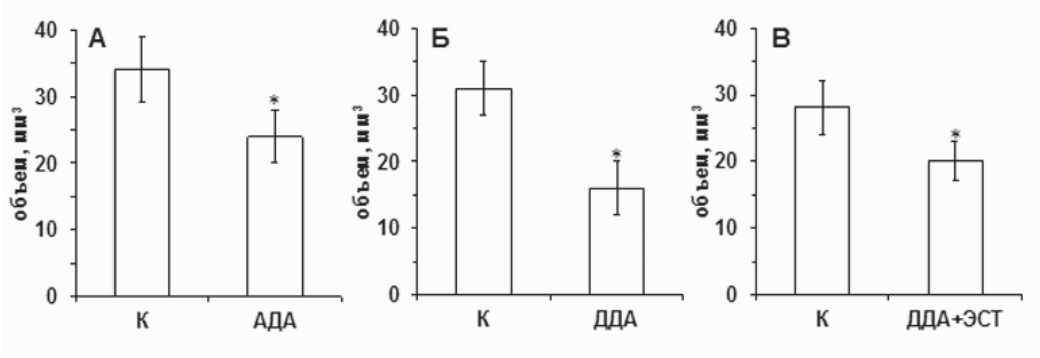


Рис. 19. Уменьшение объема очага ишемического повреждения под действием АДА и ДДА

Вещества вводили внутрибрюшинно в течение 4 суток после фототромбоза, после чего проводили морфометрию фиксированных препаратов мозга опытных животных. Дозы: А – АДА 5 мг/кг, Б – ДДА 5 мг/кг; В – ДДА 2,5 мг/кг и ЭСТ 5 мг/кг. Контрольным группам (К) вводили инъекционный раствор. *p<0,05 по сравнению с контрольной группой

ЭСТ (5 мг/кг) снижала объем ишемического очага, при этом эффект был сопоставим с таковым для ДДА, примененным во вдвое большей дозе (рис. 19В).

На гистологических препаратах зоны полутени обнаруживались характерные признаки повреждения нервной ткани: перицеллюлярный и периваскулярный отек с диффузным смещением клеток, гиперхромность, сморщивание тел нейронов, гомогенизация цитоплазмы, изменение конфигурации ядра (рис. 20А). Под действием N-ацилдофаминов в зоне полутени преобладают нейроны с неизмененной структурой, а периваскулярный отек выражен слабее (рис. 20Б).

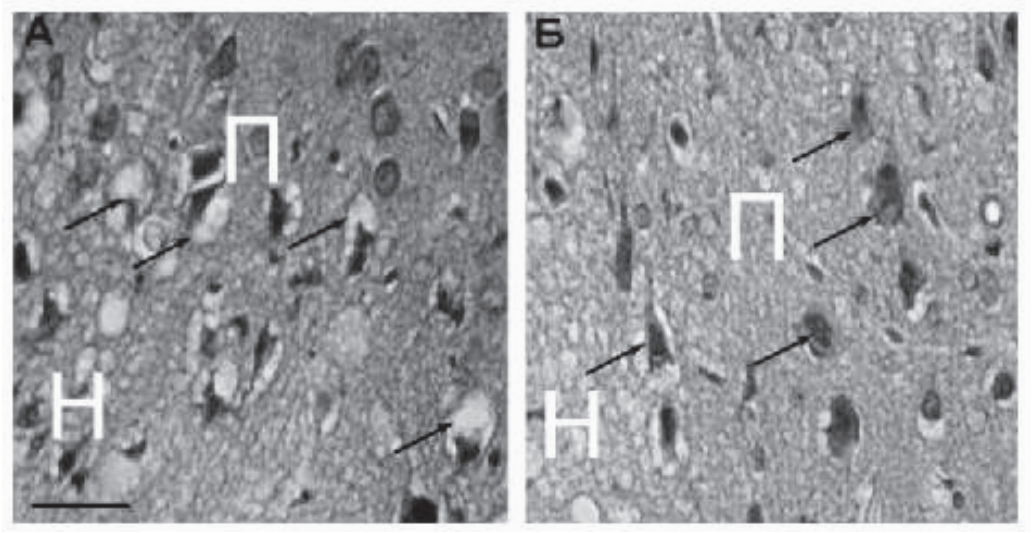


Рис. 20. Сохранение тканевой морфологии в зоне полутени под действием ДДА

Н – участок некроза, П – участок зоны полутени. А – препарат от контрольных животных, получавших инъекционный раствор. Стрелками показаны зоны перицелюлярного отека с гиперхромными сморщенными нейронами. Б – препарат от животных, получавших ДДА (5 мг/кг, 4 дня). Стрелками показаны нейроны с сохраненной структурой. Окраска гематоксилином

Электронно-микроскопическое исследование в зоне полутени на 4-е сутки после фототромбоза выявило выраженные ультраструктурные изменения: диффузный хроматолиз, немногочисленность цитоплазматических органелл, а также частичную дезагрегацию полисом и скопление ядерного хроматина, что указывает на начальные признаки апоптоза (рис. 21). Происходит резкое уменьшение в поле зрения количества синапсов, в первую очередь возбуждающих аксошипиковых контактов, а также синаптических пузырьков в аксонных терминалях, особенно в резервном пуле. В присутствии ДДА структура аксонных терминалей нормализуется, наблюдаются многочисленные мембранные пузырьки.

Дендроплазма просветляется, в матриксе шипиков появляется развитый шипиковый аппарат, который в крупных шипиках состоит из многочисленных компонентов. Появляются множественные сложно организованные, инвагинированные и перфорированные аксо-шипиковые контакты с двумя-тремя и более активными зонами.

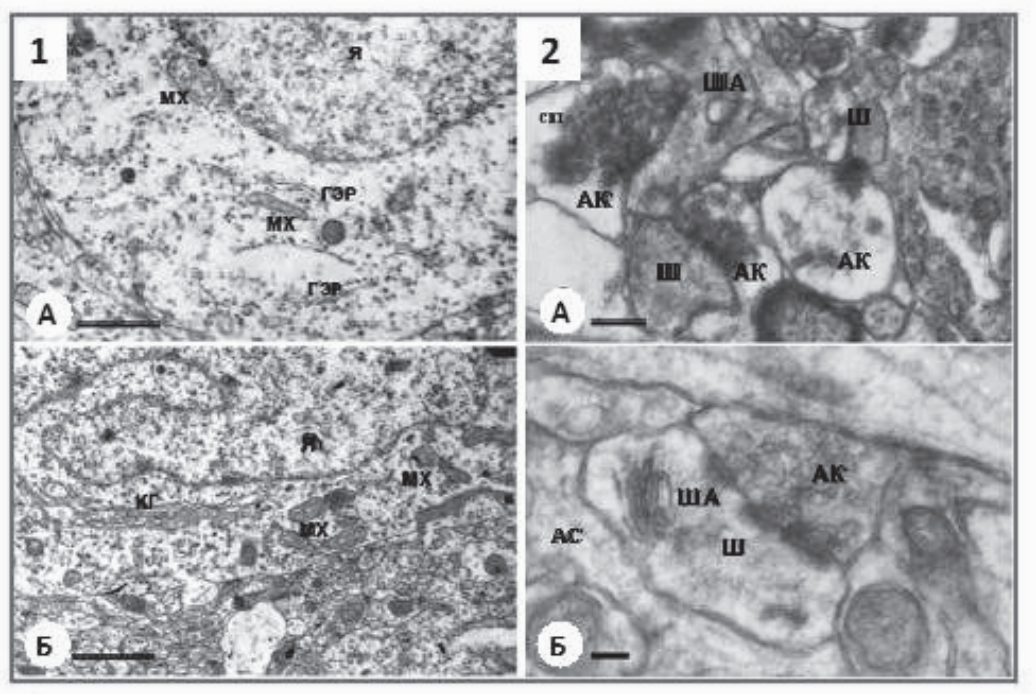


Рис. 21. Ультраструктура нейронов (1) и нейропиля (2) в пенумбре после фототромбоза в отсутствие (А) и в присутствии (Б) ДДА

1А: диффузный хроматолиз, атрофия или набухание митохондрий. 1Б: равномерное распределением хроматина, гиперплазия митохондрий и цистерн комплекса Гольджи. 2А: резкое уменьшении в поле зрения количества возбуждающих аксошипиковых контактов и синаптических пузырьков, потемнение матрикса шипиков, отсутствие или вакуолизация шипикового аппарата. 2Б: нормализация структуры аксонных терминалей, заполненных многочисленными синаптическими пузырьками, наличие крупных шипиков с многокомпонентным шипиковым аппаратом. Масштаб (черта) 0,5 мкм

Таким образом, при фокальной ишемии N-ацилдофамины могут способствовать репаративным процессам в пенумбре, происходящим в результате пластических перестроек ультраструктурных компонентов нейронов и межнейронных связей.

Важными патогенетическими факторами в развитии постишемического повреждения нервной ткани являются гемодинамические нарушения и микротромбозы на уровне микроциркуляторного русла. Поэтому нами была проведена оценка возможного влияния N-ацилдофаминов как наиболее эффективных нейропротекторов на параметры локального мозгового кровотока и агрегацию тромбоцитов (Безуглов и др., 1997; Васильева и др., 2002).

14. Влияние N-ацилдофаминов на локальный мозговой кровоток

Изучение влияния N-ацилдофаминов на локальный кровоток в коре теменной области головного мозга крыс позволило установить, что производные арахидоновой (*1d*), докозагексаеновой (*1a*), эйкозапентаеновой (*1c*) кислот улучшают кровоснабжение тканей мозга (ДДА>ЭДА>АДА). Наиболее выраженная цереброваскулярная активность выявлена у ДДА, который в дозе 2 мг/кг вызывает усиление локального мозгового кровотока в среднем на 64%. После внутривенного введения ДДА параметры кровотока оставались повышенными в течение первых двух минут, после чего происходило снижение до исходного уровня. В четырех опытах из девяти через 30–35 минут после введения ДДА наблюдалось повторное увеличение мозгового кровотока на 30%, которое продолжалось в течение 30 минут затем кровоток восстанавливался до исходного уровня (рис. 22). После введения ДДА наблюдалось повышение артериального давления, которое постепенно снижалось

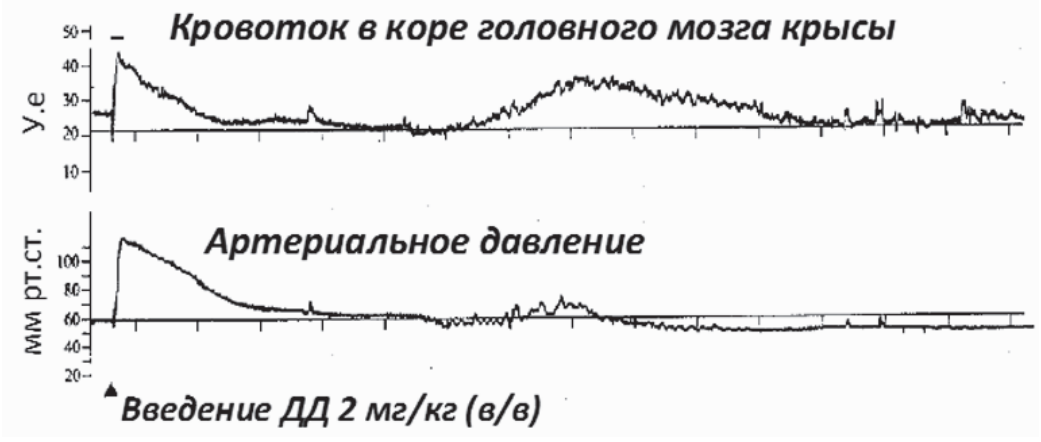


Рис. 22. Влияние дофаминамидадокозагексаеновой кислоты (ДДА) на локальный кровоток в коре головного мозга и артериальное давление у крыс

Короткая черта на верхнем графике обозначает временной интервал, равный 1 мин. Стрелка на нижнем графике указывает на момент внутривенного введения препарата. Параметры кровотока (в условных единицах) и артериального давления (в мм ртутного столба) регистрировались одновременно

и достигало контрольных величин в течение 5 минут. Далее артериальное давление не претерпевало существенных изменений, что может свидетельствовать об избирательном воздействии ДДА на тонус сосудов головного мозга (Безуглов и др., 1997).

15. Антиагрегационное действие амидов жирных кислот с дофамином и серотонином

Влияние на систему гемостаза использованных на предыдущих этапах нейролипинов оценивали по их способности тормозить агрегацию тромбоцитов человека и кролика. Агрегацию тромбоцитов человека индуцировали добавлением к тромбоцитарной плазме арахидоновой кислоты (1 мМ) либо аденозиндифосфата (АДФ, 10 мкМ). Было установлено, что антиагрегационное действие исследованных соединений зависело от используемого проагреганта. При стимуляции агрегации тромбоцитов при помощи АДФ вещества (2, 20, 200 мкМ) проявляли незначительную активность. Ингибирование наблюдали при активации тромбоцитов арахидоновой кислотой (табл. 5).

Также было проведено исследование влияния ДДА на систему гемостаза ex vivo. Для этого кроликам внутривенно вводили ДДА в дозе 10 мг/кг, после чего забирали образцы крови из вены (сразу или через 30 минут после введения), получали тромбоплазму и индуцировали агрегацию арахидоновой кислотой или АДФ. Наиболее выраженное антиагрегантное действие наблюдалось сразу после введения ДДА, через 30 мин после введения активность снижалась, но не достигала контрольных параметров (табл. 6) (Васильева и др., 2002).

Таблица 5

Влияние нейролипинов и их аналогов на агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную арахидоновой кислотой (1 мМ)

Вещество	Концентрация, мкМ			
	0	2	20	200
АДА	48±2	26±9	8±2	2±1
ДДА	58±1	41±3	19±8	2±1
АСТ	48±2		40±5	5±2
ЭСТ	42±2	27±1	2±1	5±1

Таблица 6

Влияние ДДА (10 мг/кг) на агрегацию тромбоцитов кролика *ex vivo*. Арахидоновая кислота 1 мМ, АДФ 10 мкМ

Агрегант	До введения	Сразу после введения	30 мин. после введения
Арахидонат	28±4	3±3*	20±4*
АДФ	36±3	24±2*	31±3

* Приведены значения (%) максимального падения оптической плотности после окончания реакции агрегации в тромбоцитарной плазме.

Полученные данные свидетельствуют о том, что ацилированные производные дофамина и серотонина могут оказывать нейропротекторное действие в моделях *i n vivo* как за счет воздействия на нервную ткань, так и за счет регуляции процессов гемостаза и микроциркуляции в постишемический период.

16. Нейрозащитное действие простамида и его аналогов

Анандамид и 2-арахидоноилглицерин являются субстратами индуцибельной циклооксигеназы-2, ответственной за синтез провоспалительных простагландинов. В результате образуются соответствующие этаноламиды (простамиды) и глицериновые эфиры простагландинов. Нами синтезирован простамид Е2 (PGE_2-EA) и его близкие аналоги – амиды простагландина E_2 (PGE_2) и тирамина (TA), γ-аминомасляной кислоты (GABA) и глицина (Gly) и изучено их нейрозащитное действие. Простамид E_2 (PGE_2-EA) оказывает нейрозащитное действие как в модели калиевой депривации, так и в модели глутаматной токсичности на гранулярных нейронах мозжечка крысы. В модели калиевой депривации PGE_2-EA проявлял выраженный защитный эффект в интервале концентраций 0,1–1 мкМ (максимальный эффект – 77% выживших клеток – наблюдали при концентрации 1 мкМ). В модели глутаматной токсичности простамид PGE_2-EA оказывал выраженный защитный эффект, который при концентрации 2 мкМ приводил к выживанию 50% клеток по сравнению с контролем, а при 5 мкМ – 100% (табл. 7).

Тирамид (PGE_2-TA) был несколько менее активен, чем простамид (PGE_2-EA) и в концентрации 5 мкМ его защитный эффект достигал 70% от максимального (для простамида при этой концентрации наблюдали 100-процентную защиту), а при 10 мкМ – 100%. Оба аналога простамида, эндогенные амиды PGE_2-GABA и PGE_2-Gly, оказывали выраженное нейрозащитное действие только при концентрации 10 мкМ, при этом глицинамид был активнее PGE_2-GABA. Следует отметить, что в этих экспериментах сам простагландин E_2 не проявлял регистрируемой нейрозащитной активности. Сравнение активности всех четырех простамидов показало, что амиды простагландина E_2, содержащие гидроксильную группу на терминальном конце аминного компонента, более активны, чем соединения с карбоксильной группой. Присоединение к молекуле простамида донора оксида азота, в качестве которого выступает нитроэфир по первичному гидроксилу этаноламидной части простамида (PGE_2-NEA), приводит к почти двукратному увеличению протекторного действия в модели ГНТ (см. табл. 7).

17. Онкотоксическое действие нейролипинов

Нейролипины в зависимости от структуры с разной степенью активности способны подавлять рост раковых клеток в культуре. Так, среди изученных нами 46 синтетических нейролипинов и их аналогов были выявлены соединения, обладающие антипролиферативным действием в отношении клеток глиомы С6 крыс и

Таблица 7

Нейрозащитное действие простамида и его аналогов в модели ГНТ

Соединение	Концентрация, мкМ		
	2	5	10
PGE_2	н/а	н/а	н/а
PGE_2-EA	50	100	токсичен
PGE_2-NEA	90	–	–
PGE_2-Gly	–	60	100
PGE_2-GABA	–	–	50
PGE_2-tyramine	40	70	100

глиомы U251 человека в интервале концентраций 5–100 мкМ (Андрианова и др., 2010). Наибольшую активность проявили N-ацилдофамины и гибридные соединения, содержащие остаток дофамина, а также некоторые N-ацилсеротонины. Так, на клетках глиомы U251 человека N-арахидоноилдофамин и N-арахидоноил-γ-аминобутирил-N-дофамин в концентрации 25 мкМ проявили близкую цитотоксическую активность: 20,4±2,63% и 23,6±1,13% выживших клеток по сравнению с контролем (Андрианова, 2009). Следует отметить, что N-ацилдофамины обладают выраженным токсическим действием в отношении онкотрансформированных клеток различного тканевого происхождения (глиома, лейкемия, лимфома, карцинома, саркома), но не оказывают влияния на условно-нормальные клетки (HEK293, первичная культура глии крысы) (Акимов, Безуглов, 2013).

18. Нейролипины – мультифункциональные нейрозащитные вещества

Приведенные результаты наших исследований в совокупности с данными литературы позволяют утверждать, что нейролипины способны воздействовать на различные компоненты нейродегенеративной патологии, приводя к следующим эффектам:

– повышение выживания нейронов вплоть до контрольного уровня в условиях эксайтотоксичности – производные дофамина;

– повышение выживания нейронов в условиях гипоксии (показано на переживающих культурах клеток, на переживающих срезах головного мозга и *in vivo* в модели индуцированной фокальной ишемии);

– антиоксидантное действие, в том числе в условиях окислительного стресса – производные дофамина и серотонина;

– восстановление локомоторной активности у крыс в острой модели болезни Паркинсона – производные дофамина;

– увеличение локального кровотока в головном мозге без влияния на системное артериальное давление – производные ГАМК;

– индукция апоптоза в культурах раковых клеток различного происхождения (глиома, лимфобластома) – производные дофамина;

– переключение воспаления в стадию резольвинга (завершение и ликвидация воспаления) – производные дофамина.

Можно констатировать, что полифункциональные соединения, содержащие структурный элемент нейролипинов, способны воздействовать практически на каждое звено разных стадий нейродегенеративного процесса. Это делает нейролипины перспективными для разработки новых лекарственных препаратов для профилактической и поддерживающей терапии при инсультах и других нейродегенеративных заболеваниях.

19. Гибридные мультифункциональные вещества на основе нейролипинов

Нейролипины участвуют в регуляции многих важных функций организма, включая деятельность нервной системы. Было установлено, что в зоне нейронального поражения наблюдается увеличение содержания нейролипинов, а именно – 2-арахидоноилглицерина и пальмитоилэтаноламина. Ингибирование с помощью фармакологических агентов или генетических манипуляций метаболизма как 2-арахидоноилглицерина, так и анандамида усиливает их нейрозащитное действие. Нейролипины противостоят нарушениям процессов микроциркуляции и гемостаза (N-ацилдофамины). Они противодействуют воспалению, уменьшают отек, снижают боль, блокируют инфильтрацию астроцитов (пальмитоилэтаноламин). Восполнение недостатка нейролипинового сигнала и тем самым восстановление защитной липидной системы – новый подход к коррекции нейродегенеративной патологии.

Однако использование нейролипинов как таковых не всегда оказывается эффективным. Для комплексного воздействия на такую многофакторную патологию, как нейродегенерация, требуются более сложно построенные вещества, а именно – гибридные полифункциональные соединения, основу которых составляют эндогенные биорегуляторы. Нами предложена и развивается соответствующая концепция (Безуглов, 2013). Согласно этой концепции, впервые разработаны комплексные конструкции соединений, сочетающих молекулярные фрагменты нейролипинов, нейроактивных пептидов, биогенных аминов (дофамина, тирамина) и доноров оксида азота, обоснован выбор компонентов, найдены способы их сочетания.

В рамках программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» нами разрабатываются инновационные технологии создания гибридных полифункциональных лекарственных препаратов, одновременно воздействующих на несколько фармакологических мишеней патологического процесса. В зависимости от конкретного заболевания можно подобрать соответствующие составные части гибридной молекулы, однако существенно, чтобы основные компоненты были эндогенного происхождения. Таких компонентов может быть два, три, четыре или более. Нами разработаны технологии для сочетания четырех биоактивных компонентов: липидного (этаноламидные нейролипины), пептидного (три-, пентапептиды), биогенного амина (дофамин, тирамин) и донора оксида азота. Такие молекулярные конструкции созданы впервые.

Конструкции таких гибридных соединений включают в качестве липидного компонента этаноламиды жирных кислот (арахидоновой, олеиновой, пальмитиновой, докозагексаеновой) или простамид E_2. Пептидный компонент – трипептид пролин-глицин-пролин – является субстанцией лекарственного препарата проглипрола, разработанного в ИМГ РАН под руководством академика Н.Ф. Мясоедова, обладает выраженным нейрозащитным действием. Третий компонент – доноры оксида азота (нитросерин и нитроэтаноламин) – синтезирован по оригинальной методике в ИФАВ РАН. В качестве четвертого компонента использовали дофамин и тирамин. Нами разработаны способы химического сочетания этих компонентов в различных комбинациях.

Для проверки способности модифицированного по полярной части молекулы анандамида служить транспортной формой для других биоактивных молекул впервые синтезирован новый флуоресцентный аналог анандамида, содержащий BODIPY®-FL-флуорофор, присоединенный к арахидоновой кислоте через 2,2`-(этилендиокси)-бис(этилендиамин). На клетках глиомы С6 крысы показано, что флуоресцентный аналог является субстратом клеточной системы захвата анандамида. Транспорт BODIPY-анандамида был специфическим (чувствительным к присутствию стандартного ингибитора транспорта анандамида АМ-404), зависел от температуры и имел количественные характеристики, близкие к таковым тритиймеченого анандамида: для флуоресцентного анандамида – КМ 4.5±0.9 мкМ, V_{max} 20±1 амоль/(мин·клетка) (Грецкая и др., 2014). Таким образом, была продемонстрирована способность конструкций на основе этаноламида арахидоновой кислоты (анандамида) переносить внутрь клетки молекулярные фрагменты примерно равной молекулярной массы, используя клеточную систему мембранного транспорта анандамида. На основании этих результатов была предложена новая конструкция гибридного соединения, в котором трипептид соединен с анандамидом не через N-концевую аминогруппу, а через С-концевой карбоксил.

Кроме трипептида проглипрола перспективным кандидатом на пептидную часть гибридного соединения является пентапептид HFPGP. Было изучено специфическое связывание пентапептида HFPGP, меченного по С концевому остатку пролина, с плазматическими мембранами нервных клеток головного мозга крысы. Этот пептид является активным метаболитом гептапептида семакс, обладающего нейрозащитными свойствами. Было показано, что специфическое связывание [^{3}H] HFPGP обратимо, насыщаемо при концентрации выше 150 нМ и имеет следующие характеристики: Kd=82±8 нМ, $B_{ma}x$=16,6±1,1 пмоль/мг белка мембран. Этот пептид, как и проглипрол, является активным метаболитом нейротропного пептида семакса и входит в его интерактон. Однако места специфического связывания проглипрола и HFPGP в головном мозге крысы различны: для HFPGP – в гиппокампе и мозжечке, а для PGP – только с плазматическими мембранами клеток базальных ядер переднего мозга (Вьюнова и др., 2014).

Таким образом, комбинации структуры нейролипина, пептида, донора оксида азота и дофамина позволяют сочетать в молекуле гибридного соединения различные механизмы действия, что необходимо для комплексного воздействия на нейродегенеративный патологический процесс.

Литература

Андрианова Е.Л. Про- и антиапоптотическое действие нейролипинов на нормальные и трансформированные клетки нервной системы. Автореф. дисс. канд. хим. наук. М., 2009.

Андрианова Е.Л., Бобров М.Ю., Грецкая Н.М. и др. Действие нейролипинов и их синтетических аналогов на нормальные и трансформированные глиальные клетки // Нейрохимия. 2010. Т. 27. № 1. С. 1-10.

Безуглов В.В. Новая парадигма медицинской химии – мультифункциональные лекарственные препараты // На стыке наук. Физико-химическая серия: 1 Международная научная интернет-конференция: материалы конф. Казань: ИП Синяев Д.Н., 2013. Т. 1. С. 18-22.

Безуглов В.В., Маневич Е.М., Бобров М.Ю. и др. Искусственно функционализированные полиеновые жирные кислоты – новые липидные биорегуляторы // Биоорганическая химия. 1997. Т. 23. № 3. С. 211-220.

Безуглов В.В., Грецкая Н.М., Блаженова А.В. и др. Арахидоноиламинокислоты и арахидоноилпептиды: синтез и свойства // Биоорганическая химия. 2006. Т. 32. № 3. С. 258-267.

Бобров М.Ю., Лыжин А.А., Андрианова Е.Л. и др. Антиоксидантные и нейропротекторные свойства N-докозагексаеноилдофамина // Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2006. Т. 142. № 10. С. 406-408.

Бобров М.Ю., Шевченко В.П., Юдушкин И.А. и др. Гидролиз анандамида и этаноламида эйкозапентаеновой кислоты в спленоцитах мышей // Биохимия. 2000. Т. 65. № 5 . С. 721-726.

Ведунова М.В., Митрошина Е.В., Сахарнова Т.А. и др. Влияние N-арахидоноилдофамина на функционирование нейронной сети первичной культуры гиппокампа при моделировании гипоксии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 156 . С. 447-450.

Васильева Т.М., Петрухина Г.Н., Макаров В.А. и др. Влияние дофаминамидов полиненасыщенных жирных кислот на свертываю-щую систему крови и мозговое кровообращение // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2002. Т. 65. № 6. С. 41-45.

Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Шевченко К.В. и др. Особенности специфического связывания пентапептида HFPGP, меченного по С концевому остатку пролина, с плазматическими мембранами нервных клеток головного мозга крысы. // Докл. РАН. 2014. Т. 456. № 4. С. 490-456.

Генрихс Е.Е., Барсков И.В., Бобров М.Ю. и др. Нейропротекторные свойства модуляторов эндогенной каннабиноидной системы *in vivo* и *in vitro* // Современные направления исследований функциональной межполушарной асимметрии и пластичности мозга. Экспериментальные и теоретические аспекты нейропластичности. М.: Научный мир, 2010а. С. 338-342.

Генрихс Е.Е., Бобров, М.Ю. Андрианова Е.Л., Грецкая Н.М. и др. Модуляторы эндогенной каннабиноидной системы как нейропротекторы // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2010б. Т. 4. № 4. С. 37-42.

Грецкая Н.М., Акимов М.Г., Безуглов В.В. Новый флуоресцентный аналог для исследования транспорта анандамида в клеточных культурах // Биоорганическая химия. 2014. Т. 40. № 2. С. 248-252.

Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Миронов А.А. и др. Нейропротекторное действие каннабиноида N-арахидоноилдофамина при моделировании острой гипобарической гипоксии мозга // Неврологический вестник. 2012. Т. XLIV. № 1. С. 14-19.

Рогов С.И., Шевченко В.П., Нагаев И.Ю. и др. Использование метода твердофазного гетерогенного каталитического гидрирования для получения меченного тритием этаноламина и селективно меченных тритием этаноламидов арахидоновой, эйкозапентаеновой и докозагексаеновой кислот // Радиохимия. 1997. Т. 39. № 5. С. 458-463.

Фрумкина Л.Е., Бобров М.Ю., Лыжин А.А. и др. Пластическая реорганизация синапсов гиппокампа при фармакологической блокаде каннабиноидных рецепторов 1–го типа // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2007. Т. 1. № 2. С. 17-22.

Фрумкина Л.Е., Бобров М.Ю., Лыжин А.А. и др. Влияние фармакологической блокады каннабиноидных рецепторов 1-го типа на ультраструктуру синапсов в органотипической культуре ткани гиппокампа // Неврологический вестник. 2007. Т. 39. № 4. С. 60-63.

Фрумкина Л.Е., Бобров М.Ю., Лыжин А.А. и др. Ультраструктурные перестройки синапсов гипппокампа при генетической и фармакологической блокаде каннабиноидных рецепторов 1-го типа // Структурно-функциональные, нейрохимические и иммунохимические зако-номерности асимметрии и пластичности мозга. М., 2007. С. 656-660.

Berger C., Schmid P.C., Schabitz W.-R. et al. Massive accumulation of N-acylethanolamines after stroke. Cell signalling in acute cerebral ischemia? // J. Neurochem. 2004. T. 88. № 5. P. 1159-1167.

Bermudez-Silva F.J., Viveros M.P., McPartland J.M. et al. The endocannabinoid system, eating behavior and energy homeostasis: the end or a new beginning? // Pharmacol. Biochem. Behav. 2010. T. 95. № 4. P. 375-382.

Bezuglov V., Bobrov M., Gretskaya N. et al. Synthesis and biological evaluation of novel amides of polyunsaturated fatty acids with dopamine // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2001. T. 11. № 4. P. 447-449.

Bisogno T., Melck D., Bobrov M. N-acyl-dopamines: novel synthetic CB1 cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity *in vitro* and i*n vivo* // Biochem. J. 2000. T. 824. P. 817-824.

Bisogno T., Melck D., Petrocellis L.De. et al. Arachidonoylserotonin and other novel inhibitors of fatty acid amide hydrolase // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1998. T. 248. № 3. P. 515-522.

Bobrov M., Gretskaya N., Payet O. et al. Different pharmacological profile of two closely related endocannabinoid ester analogs // Life Sci. 2005. T. 77. № 13. P. 1425-1440.

Bobrov M.Y., Lizhin A.A., Andrianova E.L. et al. Antioxidant and neuroprotective properties of N-arachidonoyldopamine // Neurosci. Lett. 2008. T. 431. № 1. P. 6-11.

Buemi M.R., Luca L. De., Chimirri A. et al. Indole derivatives as dual-effective agents for the treatment of neurodegenerative diseases: synthesis, biological evaluation, and molecular modeling studies // Bioorg. Med. Chem. 2013. T. 21. № 15. P. 4575-4580.

Castillo P.E., Younts T.J., Chávez A.E. et al. Endocannabinoid signaling and synaptic function // Neuron. 2012. T. 76. № 1. P. 70-81.

Degn M., Lambertsen K.L., Petersen G. et al. Changes in brain levels of N-acylethanolamines and 2-arachidonoylglycerol in focal cerebral ischemia in mice // J. Neurochem. 2007. T. 103. № 5. P. 1907-1916.

Deutsch D.G., Ueda N., Yamamoto S. The fatty acid amide hydrolase (FAAH) // Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids. 2002. T. 66. № 2-3. P. 201-210.

D'Mello S.R., Galli C., Ciotti T. et al. Induction of apoptosis in cerebellar granule neurons by low potassium: inhibition of death by insulin-like growth factor I and cAMP // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993. T. 90. № 23. P. 10989-10993.

Edwards F.A. Anatomy and electrophysiology of fast central synapses lead to a structural model for long-term potentiation // Physiol. Rev. 1995. T. 75. № 4. P. 759-787.

Fride E., Perchuk A., Hall F.S. et al. Behavioral methods in cannabinoid research // Methods Mol. Med. 2006. T. 123. C. 269-290.

Galiègue S., Mary S., Marchand J. et al. Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations // Eur. J. Biochem. 1995. T. 232. № 1. P. 54-61.

Gay C.A., Gebicki J.M. Perchloric acid enhances sensitivity and reproducibility of the ferric-xylenol orange peroxide assay // Anal. Biochem. 2002. T. 304. № 1. P. 42-46.

Guindon J., Hohmann A.G. The endocannabinoid system and pain // CNS Neurol. Disord. Drug Targets. 2009. T. 8. № 6. P. 403-421.

Hillard C.J., Campbell W.B. Biochemistry and pharmacology of arachidonylethanolamide, a putative endogenous cannabinoid // J. Lipid Res. 1997. T. 38. № 12. P. 2383-2398.

Hou S.T., MacManus J.P. Molecular mechanisms of cerebral ischemia-induced neuronal death // Int. Rev. Cytol. 2002. T. 221. P. 93-148.

Huang S.M., Bisogno T., Petros T.J. et al. Identification of a new class of molecules, the arachidonyl amino acids, and characterization of one member that inhibits pain // J. Biol. Chem. 2001. T. 276. № 46. P. 42639-44.

Huang S.M., Bisogno T., Trevisani M. et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. T. 99. № 12. P. 8400-8405.

Kim H.-Y., Spector A.A. Synaptamide, endocannabinoid-like derivative of docosahexaenoic acid with cannabinoid-independent function // Prostaglandins. Leukot. Essent. Fatty Acids. 2013. T. 88. № 1. P. 121-125.

Khaspekov L.G., Korotchenko S.A., Vedunova M.V. et al. Modulation of spontaneous network activity in hippocampal cell culture by glutamate and N-arachidonoyldopamine // Proceedings of III International symposium «Topical problems of biophotonics». Nizhny Novgorod, 2011. P. 232-233.

Lemak M.S., Bravarenko N.I., Bobrov M.Y. et al. Cannabinoid regulation in identified synapse of terrestrial snail // Eur. J. Neurosci. 2007. T. 26. № 11. P. 3207-3214.

Marsicano G., Goodenough S., Monory K. et al. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity // Science. 2003. T. 302. № 5642. P. 84-88.

Mechoulam R., Parker L.A. The endocannabinoid system and the brain // Annu. Rev. Psychol. 2013. T. 64. P. 21-47.

Parmentier-Batteur S., Jin K., Mao X.O. et al. Increased severity of stroke in CB1 cannabinoid receptor knock-out mice // J. Neurosci. 2002. T. 22. № 22. P. 9771-9775.

Petrocellis L. De, Melck D., Palmisano A. et al. The endogenous cannabinoid anandamide inhibits human breast cancer cell proliferation. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. T. 95. № 14. P. 8375-8380.

Pertwee R.G. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview // Int. J. Obes. (Lond). 2006. T. 30. Suppl. 1. P. S13-S18.

Sagar D.R., Smith P., Millns P.J. et al. TRPV1 and CB(1) receptor-mediated effects of the endovanilloid/endocannabinoid N-arachidonoyl-dopamine on primary afferent fibre and spinal cord neuronal responses in the rat // Eur. J. Neurosci. 2004. T. 20. № 1. P. 175-184.

Smart D., Gunthorpe M.J., Jerman J.C. et al. The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1) // Br. J. Pharmacol. 2000. T. 129. № 2. P. 227-230.

Stasiuk M., Kozubek A. Biological activity of phenolic lipids // Cell. Mol. Life Sci. 2010. T. 67. № 6. P. 841-860.

Sugiura T., Kodaka T., Kondo S. et al. Is the cannabinoid CB1 receptor a 2-arachidonoylglycerol receptor? Structural requirements for triggering a Ca2+ transient in NG108-15 cells // J. Biochem. 1997. T. 122. № 4. P. 890-895.

Sugiura T., Kodaka T., Nakane S. et al. Evidence that the cannabinoid CB1 receptor is a 2-arachidonoylglycerol receptor. Structure-activity relationship of 2-arachidonoylglycerol, ether-linked analogues, and related compounds // J. Biol. Chem. 1999. T. 274. № 5. P. 2794-2801.

Sugiura T., Kondo S., Sukagawa A. et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. T. 215. № 1. P. 89-97.

Svennerholm L. Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain // J. Lipid Res. 1968. T. 9. № 5. P. 570-579.

Toni N., Buchs P.A., Nikonenko I., et al. LTP promotes formation of multiple spine synapses between a single axon terminal and a dendrite // Nature. 1999. T. 402. № 6760. P. 421-425.

Verhoeckx K.C.M., Voortman T., Balvers M.G.J. *et al*. Presence, formation and putative biological activities of N-acyl serotonins, a novel class of fatty-acid derived mediators, in the intestinal tract // Biochim. Biophys. Acta. 2011. T. 1811. № 10. P. 578-586.

Zhang M., Martin B.R., Adler M.W. et al. Modulation of the balance between cannabinoid CB(1) and CB(2) receptor activation during cerebral ischemic/reperfusion injury // Neuroscience. 2008. T. 152. № 3. P. 753-760.

Zygmunt P.M., Ermund A., Movahed P. et al. Monoacylglycerols Activate TRPV1 – A link between phospholipase C and TRPV1 // PLoS One. 2013. T. 8. № 12. P. e81618.

Исследование фармакокинетики и фармакодинамики амидной формы нейропротекторного пептида HLDF-6 с использованием равномерно меченных изотопами водорода соединений

Ю.А. Золотарев, Г.И. Ковалев, А.К. Дадаян, В.С. Козик, Е.А. Кондрахин, Е.В. Васильева, В.М. Липкин

Содержание

1. Введение
2. Разработка метода синтеза и получения радиоактивно меченных тритием образцов пептида HLDF-6
3. Сравнительное изучение времени жизни в плазме крови крысы пептидов TGENHR и TGENHR-NH_2
4. Поиск первичной мишени пептида TGENHR-NH_2 и *ex vivo* анализ изменения рецепторных характеристик мозга при его введении
5. Влияние субхронического системного введения пептида TGENHR-NH_2 на характеристики рецепторного связывания на мембранах мозга мышей линий C57Bl/6 и Balb/c методом *ex vivo* анализа
6. Изучение влияния субхронического системного введения пептидов TGENHR-NH_2, ENHR-NH_2 и HR-NH_2 на эффективность исследовательского поведения мышей линий C57Bl/6 и Balb/c
7. Заключение

1. Введение

К числу важнейших медико-социальных проблем современности относятся цереброваскулярные и нейродегенеративные заболевания, являющиеся основной причиной смертности и инвалидизации населения в России и зарубежных стран. Нахождение путей лечения цереброваскулярных и нейродегенеративных заболеваний во многом зависит от создания и внедрения в медицинскую практику новых эффективных ноотропных и нейропротективных препаратов. Особенно перспективным является создание новых препаратов пептидной природы, характеризующихся высокой эффективностью и чрезвычайно низкой токсичностью. Введенные пептиды в тканях организма подвергаются быстрой биодеградации с образованием целого шлейфа физиологически активных пептидных фрагментов за время, составляющее, как правило, несколько минут. В силу этого проблема фармакокинетики и фармакодинамики пептидов остается во многом не решенной.

Новые возможности для получения корректных результатов при анализе фармакокинетики пептидов создаются при использовании равномерно меченных изотопами водорода пептидов, содержащих изотопную метку во всех аминокислотных остатках (Zolotarev et al., 2003). Для получения таких пептидов авторами проекта

Сокращения: ВТКИО – высокотемпературный твердофазный каталитический изотопный обмен; ЭИП – эффективность исследовательского поведения.

было предложено использовать реакцию высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО) (Золотарев и др., 2006). В Отделе химии физиологически активных соединений ИМГ РАН (возглавляемом академиком РАН Н.Ф. Мясоедовым) при активном участии заявителя данного проекта в течение ряда лет проводятся исследования по изучению твердофазных каталитических реакций с изотопами водорода, получившие признание в нашей стране и за рубежом. Заявителем данного проекта впервые описаны основные закономерности реакции ВТКИО в органических соединениях. Обнаруженная реакция представляет несомненный интерес с точки зрения синтеза изотопно-замещенных биоорганических соединений, так как позволяет проводить замещение по асимметрическим углеродным атомам с высокой степенью сохранения конфигурации оптического центра. Приоритет в использовании ВТКИО защищен патентами США, Франции и Великобритании. Результаты исследования реакции ВТКИО получили мировое признание и обобщены авторами в обзоре (Zolotarev et al, 2010). Важной особенностью реакции ВТКИО является то, что изотопный обмен в пептидах и белках происходит с сохранением физиологической активности (Золотарев и др., 2014). Изотопная метка в белках и пептидах распределена по всей молекуле, что открывает возможность мониторинга за всеми их фрагментами, образующимися при биотрансформации.

Ранее из клеток HL-60 промиелоцитарного лейкоза человека был выделен новый фактор дифференцировки HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor), в составе которого был идентифицирован шестичленный пептид HLDF-6 (TGENHR), полностью воспроизводящий дифференцирующую активность полноразмерного фактора (Kostanyan et al., 1994). Фактор дифференцировки HLDF и пептид HLDF-6 были открыты и изучены в лаборатории белков гормональной регуляции (руководитель член-корр. РАН В.М. Липкин) Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). Пептид HLDF-6 обладает широким спектром ноотропной и нейропротективной активностей (Костанян и др., 2009). Проведенные исследования на различных видах животных показали, что у интактных животных в условиях центрального и системного введения HLDF-6 в дозах 3–30 мкг/кг наблюдается улучшение формирования и сохранения долговременной памяти. Получены прямые свидетельства нейропротекторного эффекта HLDF-6 в экспериментах на первичной культуре нейрональных клеток гиппокампа, мозжечка, а также иммунокомпетентных клеток (Сторожева и др., 2006). На экспериментальных моделях клинической патологии – болезни Альцгеймера, наркозависимости, ишемического инсульта – показано, что пептид в дозах 1–50 мкг/кг снимает выраженный когнитивный дефицит и способствует восстановлению нарушенной памяти (Sewell et al., 2005). Пептид HLDF-6 обладает широким спектром ноотропной и нейропротективной активности, высокой эффективностью и значительной продолжительностью действия, что позволяет рассматривать его в качестве перспективного соединения для создания нового ноотропного и нейропротективного лекарственного препарата для профилактики и лечения цереброваскулярных и нейродегенеративных заболеваний (Костанян и др., 2006). Ранее полученные данные позволяют предположить, что препарат будет пре-

восходить применяемые аналогичные лекарственные средства как по выраженности и продолжительности терапевтического действия, так и по уровню ноотропной и нейропротективной активности. Объектом данного исследования явился новый химико-терапевтический препарат ноотропного и нейропротекторного действия на основе амидной формы пептида HLDF-6 (TGENHR-NH_2).

В публикации рассмотрены вопросы анализа биотрансформации меченого пептида в плазме крови и на мембранах клеток головного мозга крысы с использованием равномерно меченных тритием пептидов HDLF-6 в кислотной (TGENHR) и амидной форме (TGENHR-NH_2). Для описания механизма ноотропной активности использовался сравнительный анализ *ex vivo* изменения рецепторных параметров головного мозга и неинвазивный метод по оценке способности к пространственной ориентации без предварительного обучения (Ковалев, Фирстова, 2010).

2. Разработка метода синтеза и получения радиоактивно меченных тритием образцов пептида HLDF-6

Реакцию ВТКИО с газообразным тритием или дейтерием проводили при температуре 120–200°С в твердой смеси, образованной органическим веществом, нанесенным на неорганический носитель, и высокодисперсным катализатором платиновой группы. Пептид в количестве 1.0 мг растворяли в 1 мл воды и смешивали с 20 мг неорганического носителя. Воду удаляли при уменьшенном давлении при 20°С. Неорганический носитель с нанесенным препаратом смешивали с 10 мг гетерогенного катализатора платиновой группы. В ампулу объемом 10 мл помещали полученную твердую смесь, вакуумировали, заполняли газообразным тритием до давления 250 торр и проводили реакцию ВТКИО при повышенной температуре. Ампулу охлаждали, вакуумировали, продували водородом. Пептид десорбировали 20-процентным водным этанолом. Для удаления лабильного трития меченый пептид еще дважды растворяли в 20-процентном водном этаноле и упаривали досуха. Хроматографическую очистку проводили с помощью ВЭЖХ на колонке Кромасил в градиенте метанола в присутствии 0,1-процентной гептафтормасляной кислоты. Пептид упаривали и растворяли в этаноле. Реакция ВТКИО происходит в твердой фазе на новых кислотных центрах, образующихся под действием спилловер-водорода. Изотопный обмен водорода происходит по электрофильному одноцентровому синхронному механизму с образованием в переходном состоянии реакции пятикоординированного углеродного атома, при котором образуется трехцентровая связь между углеродом и обменивающимися водородными атомами. Реакция происходит с сохранением конфигурации асимметрического углеродного атома, что позволяет избежать рацемизации при изотопном обмене. Исследовано взаимодействие пептидов TGENHR и TGENHR-NH_2 с дейтерием и тритием в реакции ВТКИО. Были исследованы влияние состава и соотношения компонентов твердой фазы, выбора гетерогенного катализатора платиновой группы, температуры и длительности реакции на величину выхода и включение изотопов водорода в пептиды TGENHR и TGENHR-NH_2. В результате были найдены условия реакции ВТКИО, позволяющие

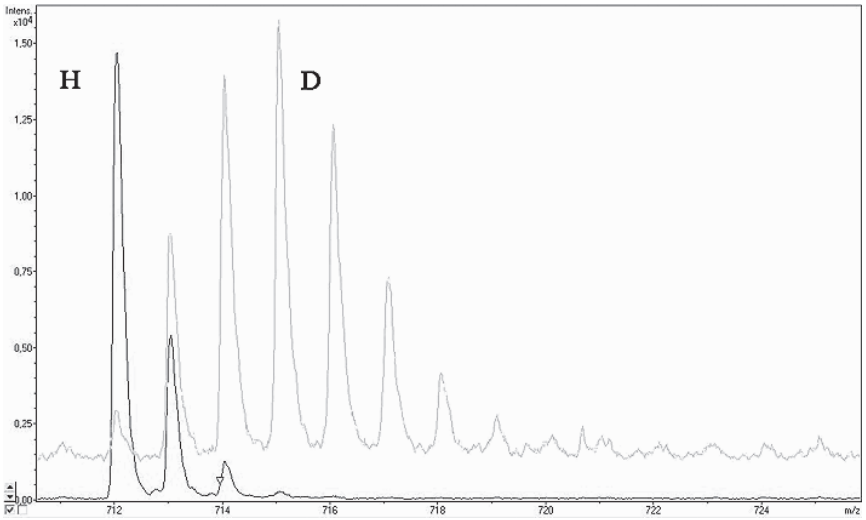


Рис. 1. MALDY масс-спектры легкого (H) и тяжелого (D) пептида TGENHR, меченного дейтерием

получить меченные тритием пептиды [^{3}H]TGENHR и [^{3}H]TGENHR-NH_2 с молярной радиоактивностью 60 и 70 Ки/ммоль. Для получения меченных тритием пептидов [^{3}H]TGENHR и [^{3}H]TGENHR-NH_2 была использована уникальная цельнопаяная установка по обмену водорода на тритий ОВТ-1 (ИМГ РАН). Изотопомерный состав меченых пептидов изучался в твердофазной реакции с газообразным дейтерием. Реакцией ВТКИО был получен меченный дейтерием пептид [^{2}H]TGENHR, содержащий около 3 атомов дейтерия на молекулу (рис. 1.).

3. Сравнительное изучение времени жизни в плазме крови крысы пептидов TGENHR и TGENHR-NH_2

Для анализа биотрансформации пептидов TGENHR и TGENHR-NH_2 использовалась ВЭЖХ продуктов взаимодействия [^{3}H]TGENHR и [^{3}H]TGENHR-NH_2 с гепариновой плазмой крови и мембранами клеток головного мозга крысы. Для хроматографии использовались последовательно соединенные УФ-детектор и проточный детектор по радиоактивности. Хроматографию проводили на колонке Кромасил С18, 150×4, 4 мкм в градиенте метанола (0–30%) в присутствии 0,1-процентной смеси трифторуксусной и гептафтормасляных кислот (4:1). Для идентификации пептидных фрагментов, образующихся при различных путях биотрансформации пептида [^{3}H]TGENHR и [^{3}H]TGENHR-NH_2 в плазме крови крысы, были синтезированы 2–5-членные пептидные фрагменты, образующиеся при различных путях биодеградации с N- и С-конца пептидной цепи. С использование меченных тритием пептидов [^{3}H]TGENHR и [^{3}H]TGENHR-NH_2 была определена фармакокинетика пептидов TGENHR и TGENHR-NH_2 в гепариновой плазме крови с исходной концентрацией 2.5 мкМ (рис. 2–5).

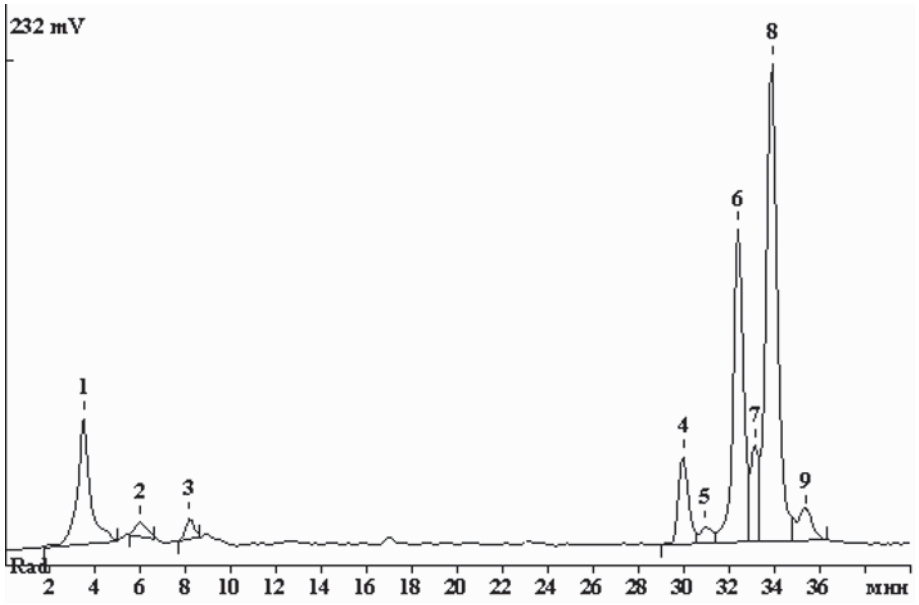


Рис. 2. Биодеградация пептида TGENHR-NH_2 в плазме крови крысы за 10 мин
Радиохроматография в градиенте метанола (0–30%) 0.08% TFA и 0.02% HFBA на колонке Кромасил C18: 4 – пептид HR-NH_2, 6 – пептид ENHR-NH_2, 8 – пептид TGENHR-NH_2

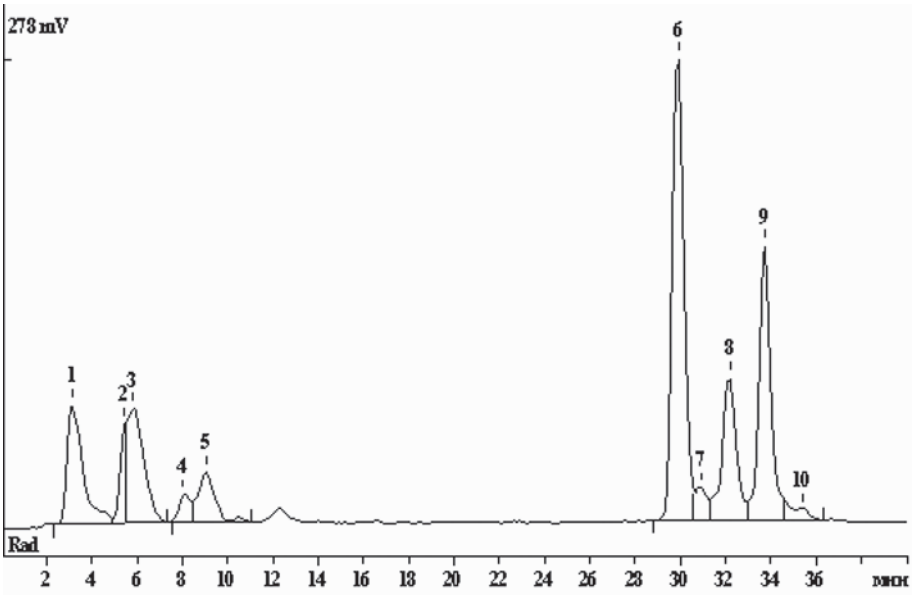


Рис. 3. Биодеградация пептида TGENHR-NH_2 в плазме крови крысы за 60 мин
Радиохроматография в градиенте метанола (0–30%), 0.08% TFA и 0,02% HFBA на колонке Кромасил C18: 6 – пептид HR-NH_2, 8 – пептид ENHR-NH_2, 9 – пептид TGENHR-NH_2

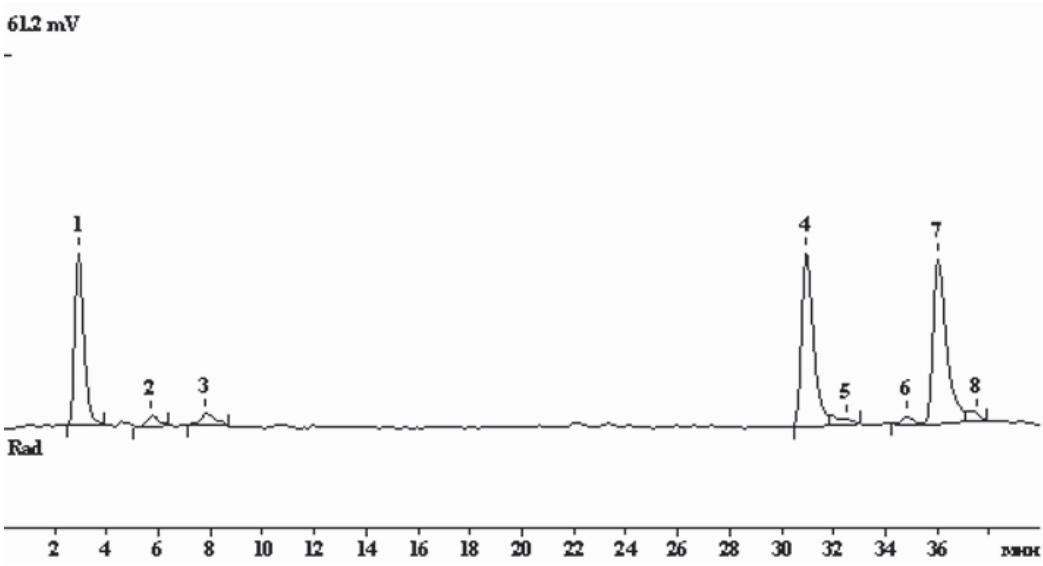


Рис. 4. Биодеградация пептида TGENHR в плазме крови крысы за 2.5 мин
Радиохроматография в градиенте метанола (0–30%), 0,08% TFA и 0.02% HFBA на колонке Кромасил С18: 4 – пептид HR, 7 – пептид TGENHR

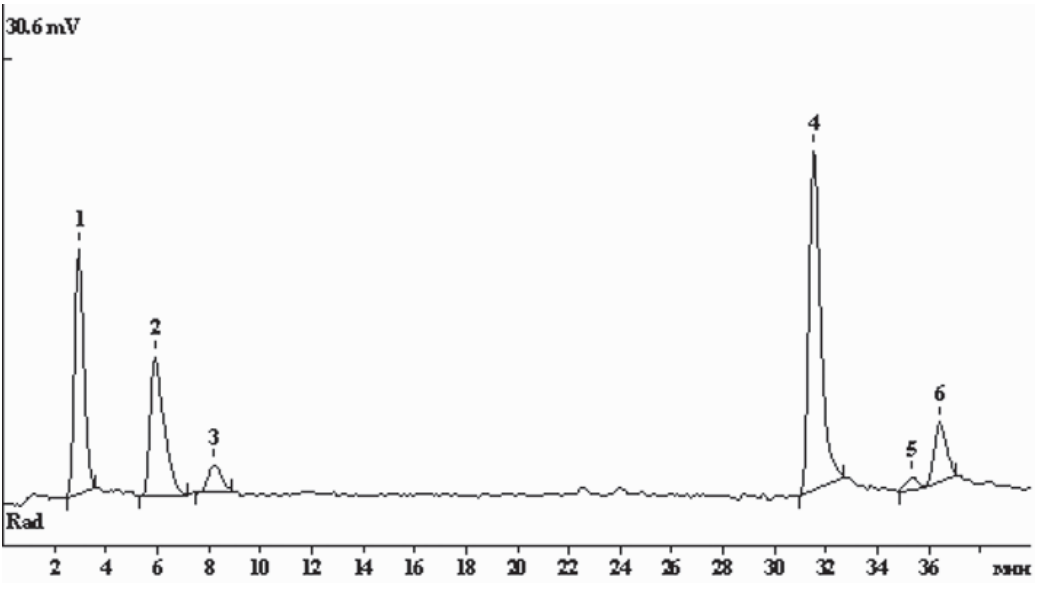


Рис. 5. Биодеградация пептида TGENHR в плазме крови крысы за 7 мин
Радиохроматография в градиенте метанола (0–30%), 0,08% TFA и 0,02% HFBA на колонке Кромасил С18: 4 – пептид HR, 6 – пептид TGENHR

В результате проведенных исследований было найдено, что пептид TGENHR-NH_2 обладает высокой устойчивостью к гидролизу в плазме крови. Период его полудеградации составляет 21 минуту, что в несколько раз больше, чем в случае пептидаTGENHR, не имеющего амидной защиты С-конца пептидной цепи. Период

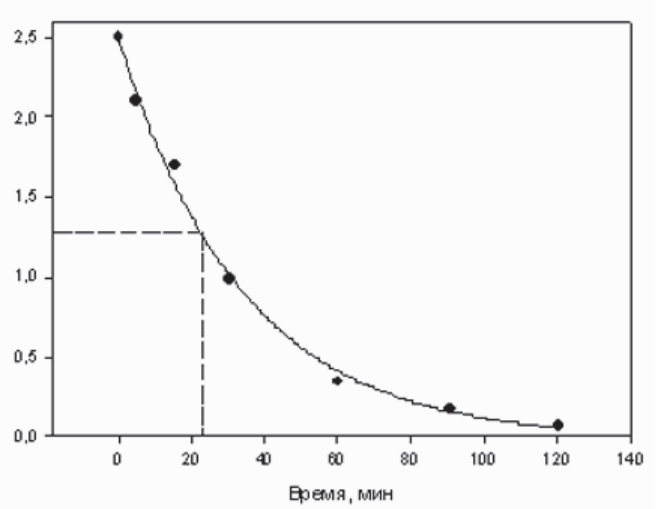


Рис. 6. Кинетика биодеградации пептида TGENHR-NH_2 в плазме крови крысы

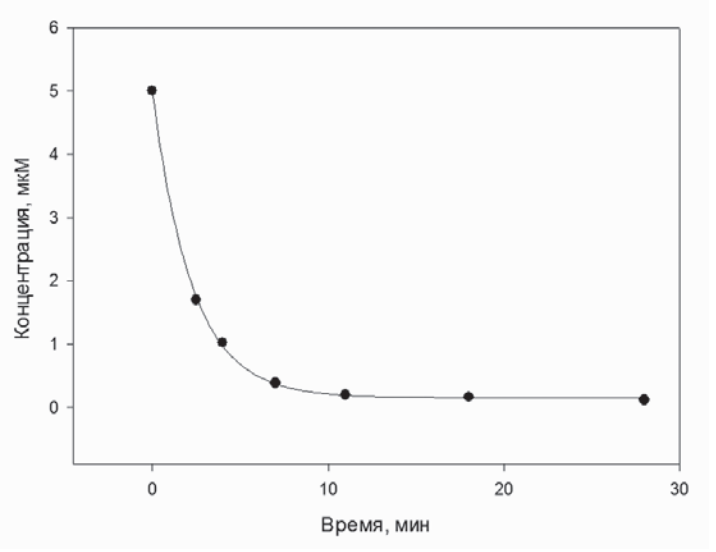


Рис. 7. Кинетика биодеградации пептида TGENHR в плазме крови крысы

полудеградации пептида TGENHR составляет 2 минуты, что находится на уровне пептидов Семакс и Селанк, также обладающих нейропротекторными свойствами (Золотарев и др., 2006) (рис. 6, 7)

Гидролиз пептида TGENHR-NH_2 происходит с N-конца пептидной цепи и основной вклад в его гидролиз в плазме крови вносят диаминопептидазы. Основные продукты гидролиза тетрапептид – ENHR-NH_2 и дипептид HR-NH_2. Гидролиз пептида TGENHR происходит с N-конца пептидной цепи и основной вклад в его гидролиз в плазме крови вносят дикарборксипептидазы. Основные продукты гидролиза – тетрапептид TGEN и дипептид HR. Также было обнаружено, что в буфе-

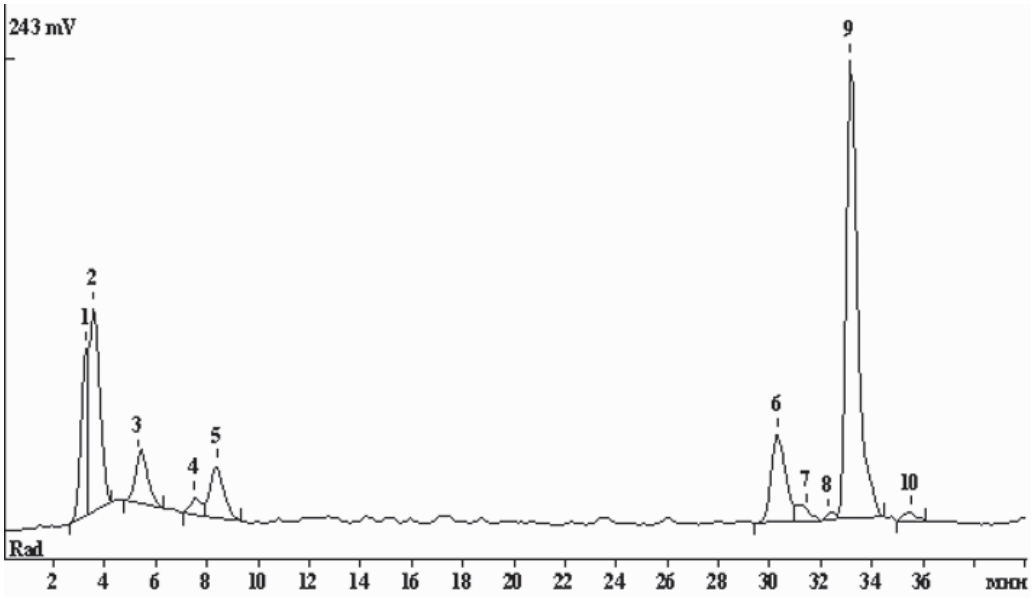


Рис. 8. Биодеградация пептида TGENHR-NH_2 на мембранах клеток мозга, 90 мин. Радиохроматография в градиенте метанола (0–30%) 0,08% TFA и 0,02% HFBA на колонке Кромасил С18: 6 – пептид HR-NH_2, 9 – пептид TGENHR-NH_2

ре, используемом для радиолигандного анализа, пептиды обнаруживают высокую стабильность при взаимодействии с мембранами клеток головного мозга крысы (рис. 8). После взаимодействия пептида с мембранным препаратом в течение 90 минут при 37°С сохраняется более 80% меченного тритием пептида [^{3}H]TGENHR-NH_2. Таким образом, было показано, что эти условия могут быть использованы при выборе параметров радиолигандного связывания. Был поведен анализ нейропротекторной активности пептидов ENHR-NH_2 и дипептида HR-NH_2, показавший, что пептид HR-NH_2 является активным метаболитом, обладающим высокой ноотропной активностью, соизмеримой с активностью пептида TGENHR-NH_2.

4. Поиск первичной мишени пептида TGENHR-NH_2 и *ex vivo* анализ изменения рецепторных характеристик мозга при его введении

Ранее в многочисленных экспериментах было показано, что пептид HLDF-6 обладает высокой ноотропной и нейропротекторной активностью, однако механизм психо- и нейротропного действия данного пептида остается, в основном, нераскрытым. В связи с этим была изучена роль рецепторов, предположительно контролирующих уровень исследовательской активности и тревожности. Был проведен поиск предполагаемых мест специфического связывания пептида TGENHR-NH_2 и исследовано изменение рецепторных параметров мозга при его субхроническом системном введении. Специфическое связывание пептида исследовали методом

радиолигандного анализа *in vitro* на мембранах мозга крысы с использованием меченного тритием пептида [^{3}H]TGENHR-NH_2, а влияние субхронического системного введения пептида TGENHR-NH_2 исследовали методом *ex vivo* анализа изменения плотности глутаматных, никотиновых и серотониновых рецепторов на мембранах префронтальной коры и гиппокампа мозга мышей инбредных линий C57Bl/6 и Balb/c, применяя меченные тритием селективные лиганды к этим рецепторам.

В экспериментах по поиску предполагаемых мест специфического связывания пептида HLDF-6 за основу был взят метод, описанный в работе (Долотов и др., 2003), посвященной поиску специфических мест связывания для пептида Семакс в модификациях. Крыс линии Вистар (самцы) декапитировали, извлеченный мозг промывали и гомогенизировали в 10 объемах 10 мМ Трис-HCl буфера, pH=7,4, содержащего 0,32 М сахарозу, 1 мМЭДТА, 1 мМ бензамидин и 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид (буфер 1). Гомогенизацию и все последующие операции проводили при температуре 40°C. Гомогенат центрифугировали в течение 20 мин при 1000 g, и супернатант подвергали повторному центрифугированию при 40 000 g в течение 30 мин. Плотный коричневый осадок на дне пробирки, обогащенный митохондриями, отбрасывали, а менее плотный светлый осадок суспендировали в буфере 1, переносили в чистую пробирку и дважды промывали этим буфером, осаждая мембраны центрифугированием, аналогичным предыдущему. По окончании промывок осадок суспендировали в 10 мМ Трис-HCl, pH=7,4, содержащем 0,22 М сахарозу и 1 мг/мл БСА, и хранили в жидком азоте. Концентрация белка для хранения, определенная по модифицированному методу Лоури, составляла 5–10 мг/мл.

Исследуемый пептид TGENHR-NH_2 в диапазоне концентраций от 10^{-4} до 10^{-9}М не обнаружил эффекта конкуренции с меченным [^{3}H]TGENHR-NH_2 за предполагаемые рецепторные места связывания как при времени инкубации – 15 минут, так и при инкубации в течение 60 минут. Вариации pH среды инкубации (6.5, 7.4 и 8.0) также не способствовали выявлению специфического связывания лиганда на мембранах. В этом году получен только небольшой объем предварительных данных, которые необходимо существенно дополнить, для того чтобы прийти к определенным выводам о первичной мишени гептапептида TGENHR-NH_2 на мембранах головного мозга.

5. Влияние субхронического системного введения пептида TGENHR-NH_2 на характеристики рецепторного связывания на мембранах мозга мышей линий C57Bl/6 и Balb/c методом *ex vivo* анализа

Выбор лиганда для радиорецепторных исследований *ex vivo* осуществляли в соответствии с рекомендациями IUPHAR. При радиолигандном анализе NMDA-рецепторов использовали [^{3}H-G](+)МК-801, синтезированный реакцией ВТКИО с молярной радиоактивностью 210 Ки/ммоль (Золотарев и др., 2009). Молярная радиоактивность этого препарата на порядок выше, чем у коммерчески доступного

селективно меченного тритием препарата фирмы NEN. Для анализа серотониновых 5-HT_{2a} и никотиновых н-АХ-рецепторов использовали [G-^{3}H]кетансерин и (-)[G-^{3}H]никотин с молярной радиоактивностью 114 и 140 Ки/ммоль, соответственно (Zolotarev et al., 2010).

Рецепторный компонент механизма действия пептида был проведен сравнительным анализом изменения плотности NMDA-глутаматных, 5-HT_{2a}-серотониновых и н-АХ-никотиновых рецепторов на мембранах префронтальной коры и гиппокампа мозга мышей инбредных линий С57Bl/6 и Balb/c. Мыши линии Balb/c с исходным когнитивным дефицитом характеризуются меньшей плотностью исследуемых рецепторов.

Плотность мест связывания [G-^{3}H]МК-801 с NMDA-рецепторами в гиппокампе мышей линии Balb/c меньше на 23%, чем у мышей линии С57Bl/6. Плотность мест связывания 5-HT_{2a}-серотониновых и н-АХ-никотиновых рецепторов на мембранах префронтальной коры мозга также оказалась на 30–35% меньшей у мышей линий Balb/c, чем у мышей линии С57Bl/6.

Ткань гиппокампа гомогенизировали в гомогенизаторе Potter S («тефлон–стекло») в 10 объемах 5 мМ HEPES и 4,5 мМ Tris-base (pH=7,6), содержащего 0,32 М сахарозу (буфер №1). Гомогенат разбавляли до 50 объемов буфера для исследования 2 (5 мМ HEPES и 4,5 мМ Tris-base) (pH=7,6) и центрифугировали 10 мин при 1000 g. Супернатант отбирали и вновь центрифугировали 20 мин при 25 000 g. Осадок гомогенизировали в 50 объемах буфера 2 и центрифугировали 20 мин при 8 000 g. Супернатант и его мягкий, зыбкий надслой отбирали и центрифугировали 20 мин при 25 000 g. Полученный осадок суспендировали в буфере 3 (5 мМ HEPES и 4,5 мМ Tris-base, содержащем 1 мМ Na_4EDTA, pH=7,6 и суспензию вновь центрифугировали. Такую процедуру отмывки проводили четырежды, причем при последней отмывке EDTA был исключен из состава. Конечный осадок ресуспендировали в 5 объемах буфера 2 и сохраняли в жидком азоте.

Реакционная смесь содержала 200 мкл буфера 2, 50 мкл меченого лиганда (50 нМ) и 250 мкл белковой суспензии. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 50 мкл немеченого лиганда. Инкубационная смесь содержала 200 мкл буфера 2, 50 мкл меченого лиганда (50 нМ) и 250 мкл суспензии белка. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 50 мкл немеченого (+)МК-801. Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Измерение радиоактивности осуществляли жидкостно-сцинтилляционным методом на счетчике TriCarb TR290. Эффективность счета составляла 42–47%. Показатели количества мест связывания лиганда (B_{max}, фмоль/мг белка) и константу диссоциации лиганд-рецепторных комплексов (Kd, нМ) рассчитывали с помощью программы GraphPadPrizm 4 Demo, статистическую обработку проводили по программе Statsoft 6,0. Концентрацию белка определяли стандартным методом Лоури.

Результаты радиорецепторного анализа связывания лиганда [^{3}H-G](+)МК801с NMDA-рецепторами, участвующими в регуляции когнитивных форм поведения, были представлены после обработки по Скетчарду (рис. 9).

Анализ влияния на NMDA-рецепторы гиппокампа мышей линии Balb/c показывает, что субхроническое введение пептида приводит к возрастанию величины

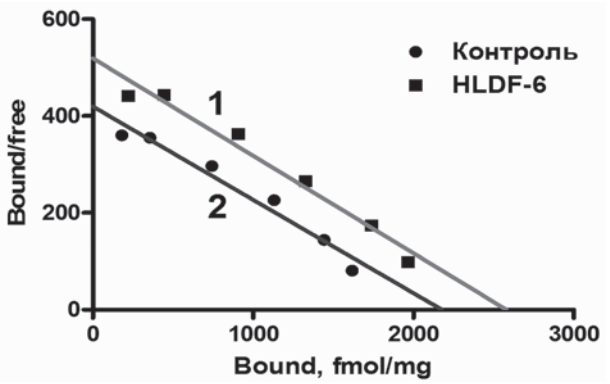


Рис. 9. График Скетчарда, отражающий влияние субхронического внутрибрюшинного введения пептида TGENHR-NH_2 на характеристики рецепторного связывания [^{3}H-G](+)МК-801 с NMDA-рецепторами на мембранах мозга гиппокампа мышей линии Balb/c

B_{max}, отражающей плотность соответствующих рецепторов, с 2115±36 фмоль/мг белка в контрольной группе до 2527±43 фмоль/мг белка после субхронического введения препарата. В то же время, в мозге мышей C57Bl/6 изменения в рецепторных характеристиках не отмечаются: плотность мест связывания лиганда в контрольной группе – 2734±44 фмоль/мг, а после субхронического введения препарата эта величина составила 2625±55 фмоль/мг белка.

После 5-кратного системного введения амидной формы пептида TGENHR-NH_2 в ежедневной дозе 100 мкг/кг величина плотности мест связывания [G-^{3}H]МК-801 с NMDA-рецепторами в гиппокампе мышей Balb/c увеличилась на 21% относительно интактного контроля. При этом величина плотности NMDA-рецепторов в гиппокампе мышей Balb/c приблизилась к соответствующему значению для группы сравнения, представленной мышами линии C57Bl/6, относительно которой препарат был неэффективен. Субхроническое введение пептида в равной степени уменьшало плотность 5-HT_{2a}-серотониновых рецепторов у обеих линий и не оказывало влияния на никотиновые н-АХ-рецепторы (табл. 1). Результаты, полученные при исследовании влияния амидной формы пептида HLDF-6 на нейрохимические процессы с помощью радиолигандного анализа, показывают, что в механизм этих фармакологических эффектов с высокой степенью вероятности вовлечена глута-

Таблица 1

Влияние субхронического системного введения пептида TGENHR-NH_2 на изменение плотности глутаматных (NMDA), серотониновых (5-HT_{2a}) и никотиновых рецепторов (н-АХ) на мембранах префронтальной коры и гиппокампа мозга, а также эффективность исследовательского поведения (ЭИП) мышей инбредных линий C57Bl/6 и Balb/c

Параметр	Мыши линии	
	C57Bl/6	Balb/c
Плотность рецепторов NMDA	–	↑
Плотность рецепторов 5-HT_{2a}	↓	↓
Плотность рецепторов н-АХ	–	–
ЭИП	–	↑

матергическая система гиппокампа, в частности NMDA-тип рецепторов. NMDA-рецепторы являются одной из важнейших мишеней для воздействия ноотропных и нейропротекторных лекарственных препаратов, так как они принимают определяющее участие в регуляции уровня выживаемости и гибели

6. Изучение влияния субхронического системного введения пептидов TGENHR-NH_2, ENHR-NH_2 и HR-NH_2 на эффективность исследовательского поведения мышей линий C57Bl/6 и Balb/c

Ранее было установлено, что специфическое действие ноотропных препаратов проявляется преимущественно в условиях когнитивного дефицита и сниженной восстановительной способности мозга (Воронина, Середенин, 2007; Фирстова и др., 2009; Васильева и др., 2013). Предполагаемое воздействие на когнитивное поведение изучали неинвазивным методом в тесте «крестообразный лабиринт». Данный неинвазивный метод основан на использовании врожденных индивидуальных способностей животных по пространственной ориентации в новой обстановке без предшествующего обучения, что принципиально отличает его от методов УРПИ и УРАИ. Тест способен выявлять положительный эффект психотропных препаратов на когнитивную активность, а также влияние препаратов на тревожность, вызванную новизной обстановки. Для моделирования сниженной эффективности исследовательского поведения (ЭИП) в крестообразном лабиринте были использованы мыши инбредных линий C57Bl/6 и Balb/c. Особи инбредной линии Balb/c характеризуются величиной ЭИП в лабиринте по сравнению с мышами линии C57Bl/6. Показатель ЭИП у мышей Balb/c оказался ниже, чем у C58Bl/6 на 13%.

Пептид вводили внутрибрюшинно, в дозе 100 мкг/кг/день в течение 5 суток подряд. Последнее введение осуществляли за 30 мин до поведенческой сессии. Данные о избирательном фармакологическом эффекте, связанном с ноотропной активностью пептидов, получают из анализа изменения параметров исследовательского поведения F_PtrN (заходы, затрачиваемые на первый полный обход всех 4 боковых отсеков лабиринта) и PatrN (число полных обходов тупиков за сессию). Сравнение групп плацебо подтверждает эти данные по обоим параметрам исследовательского поведения: мыши Balb/c затрачивают на первый полный обход всех 4 боковых отсеков лабиринта (F_PtrN) в среднем 5,7 заходов, тогда как у мышей C57BL/6 уходит 4,8 посещений, что на 14% лучше. Аналогичным образом различие проявляется и по второму параметру – числу полных обходов тупиков за сессию (PatrN). Субхроническое введение пептида увеличивает оба показателя ЭИП для мышей с дефицитом исследовательской активности до значений в группе C57Bl/6, демонстрируя избирательность действия в отношении дефицита исследовательского поведения (см. табл. 1).

Сравнение групп плацебо позволило сделать вывод, что субхроническое внутрибрюшинное введение пептида TGENHR-NH_2 увеличивает показатель ЭИП для мышей Balb/c с дефицитом исследовательской активности и не оказывает воздействия на этот показатель для мышей линии C57Bl/6. Таким образом, пептид

TGENHR-NH_2 обладает избирательностью действия в отношении дефицита исследовательского поведения животных. В серии сравнительных поведенческих экспериментов продемонстрирован избирательный фармакологический эффект пептида TGENHR-NH_2 на исследовательскую активность мышей Balb/c с исходным когнитивным дефицитом. В радиорецепторных исследованиях была также подтверждена ноотропная активность препарата. Такая направленность фармакологического эффекта характерна для известных препаратов ноотропного типа действия – пирацетама, фенотропила, пантогама, Семакса.

Были получены данные о возможном вкладе фрагментов пептида TGENHR-NH_2, образующихся при его биодеградации, в наблюдаемый ноотропный эффект. Было найдено, что при внутрибрюшинном введении в дозе 100 мкг/кг/день в течение 5 суток подряд пептид ENHR-NH_2 не оказывает влияния на величину ЭИП, в то время как дипептид HR-NH_2 практически так же увеличил исходно низкий показатель ЭИП для мышей линии Balb/c, как и гексапептид TGENHR-NH_2.

Показано, что образующийся при биотрасформации пептидный фрагмент HR-NH_2 характеризуется в несколько раз большим периодом полураспада, чем исходный пептид TGENHR-NH_2, и обладает высокой ноотропной активностью. По-видимому, образующийся при биотрансформации в тканях организма активный метаболит – пептид HR-NH_2, может вносить существенный вклад в ноотропную активность пептида TGENHR-NH_2.

7. Заключение

Исследовано взаимодействие амидной формы гексапептида HLDF-6 с дейтерием и тритием в реакции ВТКИО. Найдены условия реакции ВТКИО, позволяющие получить высоко меченный тритием пептид [^{3}H]TGENHR-NH_2 с высокой молярной радиоактивностью. Проведен анализ биотрансформации пептида TGENHR-NH_2 в плазме крови и на мембранах клеток головного мозга крысы с использованием меченного тритием пептида [^{3}H]TGENHR-NH_2. В результате проведенных исследований было найдено, что амидная форма пептида HLDF-6 обладает высокой устойчивостью к гидролизу в плазме крови, значительно превосходя по этому параметру пептид, не имеющий амидной защиты С-конца пептидной цепи. Показано, что основной вклад в гидролиз пептида TGENHR-NH_2 в плазме крови вносят диаминопептидазы, при этом основными долгоживущими продуктами гидролиза пептида TGENHR-NH_2 в плазме крови являются тетрапептид ENHR-NH_2 и дипептид HR-NH_2. Пептид HR-NH_2 является активным метаболитом, обладающим ноотропной активностью, близкой к исходному пептиду TGENHR-NH_2. Предварительная работа по поиску первичной мишени пептида TGENHR-NH_2 не позволила обнаружить специфические места связывания для [^{3}H]TGENHR-NH_2.

Результаты, полученные при исследовании влияния амидной формы пептида HLDF-6 на исследовательское поведение на неинвазивной модели и при радиолигандном анализе нейрохимических процессов, показывают, что в механизм этих фармакологических эффектов с высокой степенью вероятности вовлечена глута-

матергическая система гиппокампа, в частности, NMDA-тип рецепторов. В серии сравнительных поведенческих экспериментов продемонстрирован избирательный фармакологический эффект пептида TGENHR-NH_2 на исследовательскую активность мышей Balb/c с исходным когнитивным дефицитом. У этих же мышей был изучен рецепторный компонент механизма действия пептида. Было показано, что у мышей линии Balb/c как показатели ЭИП, так и плотность NMDA-рецепторов оказались ниже, чем у мышей линии C58Bl/6. После 5-кратного системного введения амидной формы пептида HLDF-6 в ежедневной дозе 100 мкг/кг как показатели ЭИП, так и величина плотности NMDA-рецепторов в гиппокампе мышей Balb/c значительно увеличилась, достигая высоких значений в контрольной группе (C57Bl/6), относительно которой препарат был неэффективен. Таким образом, специфическая ноотропная активность пептида связана с воздействием как минимум на глутаматергическую рецепторную систему мозга.

Литература

Васильева Е.В., Золотарев Ю.А., Ковалев Г.И. Влияние ноотропных препаратов на метаботропные глутаматные рецепторы мозга мышей Balb/c и C57Bl/6 // Нейрохимия. 2013. Вып. 30. № 2. С. 135-141.

Воронина Т.А., Середенин С.Б. Ноотропные и нейропротекторные средства // Экспер. и клин. фармакол. 2007. Вып. 70. № 4. С. 44-58.

Долотов О.В., Середенина Т.С., Левицкая Н.Г. и др. Гептапептид Семакс стимулирует экспрессию BDNF в различных отделах мозга крысы *in vivo* // Докл. РАН. 2003. Вып. 391. № 1. С. 131-134.

Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Долотов О.В. и др. Равномерно меченные тритием пептиды в исследованиях по их биодеградации *in vivo* и *in vitro* // Биоорган. химия. 2006. Вып. 32. № 2. С. 80-88.

Золотарев Ю.А., Фирстова Ю.Ю., Абаимов Д.А. и др. Меченные изотопами водорода лиганды к дофаминовым и глутаматным рецепторам МК-801 и 7-OH-DPAT // Биоорган. химия. 2009. Вып. 35. № 3. С. 323-333.

Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Козик В.С.и др. Твердофазный изотопный обмен водорода на дейтерий и тритий в генно-инженерном инсулине человека // Биоорган. химия. 2014. Вып. 40. № 1. С. 26-35.

Ковалев Г.И., Фирстова Ю.Ю. Ноотропные препараты: разные мишени – общий эффект // Клиническая фармакология и терапия. 2010. Вып. 19. № 6. С. 72-73.

Костанян И.А., Жохов С.С., Сторожева З.И. и др. Нейропротекторное действие гексапептида HLDF-6 на нейроны гиппокампа крысна модели болезни Альцгеймера *in vitro* и *in vivo* // Биоорган. химия. 2006. Вып. 32. № 4. С. 399-407.

Костанян И.А., Сторожева З.И., Семенова Н.А., Липкин В.М. Пептид HLDF–6 уменьшает когнетивные дисфункции и поражения мозга, вызванные хронической ишемизацией мозга крыс // Докл. РАН. 2009. Вып. 428. № 4. С. 1-5.

Сторожева З.И., Прошин А.Т., Жохов С.С. и др. Гексапептиды HLDF-6 и PEDF-6 восстанавливают память у крыс при хроническом введении пептида бета-амилоида Ав(25-35) в желудочки мозга // Бюлл. эксп. биол. и мед. 2006. Вып. 141. № 3. С. 292-296.

Фирстова Ю.Ю., Долотов О.В., Кондрахин Е.А. и др. Влияние ноотропных препаратов на уровень BDNF в гиппокампе и коре мозга мышей с различной эффективностью исследовательского поведения // Экспер. и клин. фармакол. 2009. Вып. 72. № 6. С. 3-7.

Kostanyan I.A., Astapova M.V., Starovoytova E.V., Dranitsyna S. M., Lipkin V.M. A new human leukemia cell 8.2 kDa differentiation factor: Isolation and primary structure determination // FEBS Letters. 1994. Vol. 356. № 2-3. P. 327-329.

Sewell R.D., Gruden M.A., Pache D.M. et al. Is the human leukaemia differentiation factor fragment HLDF6 improve memory via brain DNA and protein synthesis // J. Psychopharmacology. 2005. Vol. 19. P. 602-608.

Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Bocharov E.V. et al. New development in the tritium labelling of peptides and proteins using solid-state catalytic isotopic exchange with spillover-tritium // Amino Acids. 2003. Vol. 24. № 4. P. 325-333.

Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Borisov Yu.A., Kozik V.S. Solid state isotope exchange with spillover hydrogen in organic compounds // Chemical Rev. 2010. Vol. 110. P. 5425-5446.

Нейропротектирующее действие иммуномодуляторов на дегенерирующие нейроны гиппокампа как основа для поиска лекарственных веществ

О.В . Годухин, Е.А. Туровский, М.В. Туровская, Е.А. Туховская, С.Г. Левин, Т.А. Савина, Т.Г. Щипакина, М.В. Конаков, В.П. Зинченко, А.Н. Мурашов

Содержание

1. Введение
2. Нейропротектирующее действие ИЛ-10 на разных моделях гипоксии и ишемии i*n vitro* и *in vivo*
3. Клеточно-молекулярные механизмы, лежащие в основе быстрого нейропротектирующего действия ИЛ-10 на мозг
   3.1. Роль функциональной активности кальций-зависимых калиевых каналов большой проводимости и фоновых 2P калиевых каналов в нейропротектирующем действии ИЛ-10
   3.2. Модулирующее действие ИЛ-10 на внутриклеточные Ca^{2+}-ответы при индуцируемом гипоксией или ишемией повреждении культивируемых клеток гиппокампа
   3.3. ИЛ-10 восстанавливает вызванное гипоксией угнетение экспрессии α-субъединицы Ca^{2+}/кальмодулин-зависимой протеинкиназы
   3.4. ИЛ-10 восстанавливает вызванное гипоксией угнетение экспрессии GluA1-субъединицы AMPA рецепторов глутумата
4. Заключение

1. Введение

Индуцируемая гипоксией или ишемией гибель клеток организма является одной из главных причин смертности людей или их инвалидности, а ишемический инсульт занимает третье место после инфаркта миокарда и опухолевых заболеваний по количеству смертельных исходов среди населения в мире. Для того чтобы снизить этот показатель, необходимо, с одной стороны, понять механизмы индуцируемой гипоксией/ишемией гибели клеток, а с другой – выявить эндогенные защитные механизмы, предотвращающие эту гибель. Фундаментальным принципом организации биологических систем как на уровне отдельных клеток, так и на уровне целого организма является существование повреждающих (вызывающих гибель клеток) и защитных (способствующих выживанию клеток) сигнальных путей, которые индуцируются в ответ на стрессовые (потенциально патологические) стимулы (Leker, Shohami, 2002). Известно, что различные по своей этиологии нейродегенеративные процессы в мозге, вызванные, в частности, ишемией/гипо-

---

Сокращения: ИЛ-10 – интерлейкин-10; CaMKII – Ca^{2+}/кальмодулин-зависимая протеинкиназа II; rtPA – рекомбинантный активатор тканевого плазминогена.

ксией, судорожной активностью, механической травмой, а также аутоиммунными заболеваниями, характеризуются рядом сходных патогенетических механизмов, включающих локальную активацию микроглии и астроцитов, повышенную продукцию потенциально нейротоксических провоспалительных цитокинов, воспалительный ответ, активацию иммунной системы, экзайтотоксичность и гипервозбудимость нейронов (Asadullan et al., 2003; Marchetti, Abbracchio, 2005; Tian et al, 2012; Vezzani et al., 2013).

Несмотря на значительные успехи в выяснении элементов и организации сигнальных систем, запускающих защитные механизмы клеток, до настоящего времени подходы, основанные на знании этих механизмов, эффективно не используются для устранения индуцируемой гипоксией или ишемией гибели клеток мозга. Ключевой причиной этого является то, что при вышеназванных патологических условиях активируются множественные одновременно возникающие патофизиологические сигнальные каскады, приводящие к гибели клеток по типу некроза, апоптоза, аутофагии или их гибридных форм (Martin, 2002; Harukuni, Bhardwaj, 2006; Nixon, 2013). Это позволяет утверждать, что разработанные к настоящему времени протектирующие воздействия, направленные, как правило, на блокирование парциальных реакций патофизиологических сигнальных механизмов гибели клеток являются мало-эффективными (Mehta et al., 2007; Obrenovitch, 2008; Stankowski, Gupta, 2011; Puyal et al., 2013).

Можно выделить, по крайней мере, три фазы гибели нейронов мозга (органа, который является наиболее чувствительным к повреждающему действию гипоксии/ишемии) во время ишемического инсульта: 1 фаза связана с остановкой кровообращения и обеспечения клеток кислородом и питательными веществами; 2 фаза обусловлена массивным высвобождением возбуждающего нейромедиатора глутамата (эксайтотоксичность) и 3 фаза гибели связана с хроническим воспалением, индуцируемым высвобождением провоспалительных цитокинов. К настоящему времени идентифицированы множественные клеточно-молекулярные механизмы, вовлеченные в гибель нейронов после ишемического инсульта, включающие, в частности, трансмембранный ионный дисбаланс, периинфарктную деполяризацию, окислительный стресс, глутаматную эксайтотоксичность и накопление ионов кальция в клетках. Однако до настоящего времени клинические испытания различных нейропротекторов при ишемии/гипоксии (а было протестировано большое число терапевтических агентов, включая антагонисты рецепторов глутамата, блокаторы кальциевых каналов, антиоксиданты и т.д.) не дали положительных результатов (Stankowski, Gupta, 2011). К настоящему времени из новых препаратов за рубежом одобрен только рекомбинантный активатор тканевого плазминогена (rtPA) для лечения ишемического инсульта, недостатком которого является то, что лечение с его использованием имеет узкое временное терапевтическое окно (около 3 часов после инсульта) и повышает риск внутримозговых кровоизлияний. Современные экспериментальные и клинические наблюдения указывают на то, что стратегия протекции при лечении индуцируемых гипоксией/ишемией повреждений клеток, тканей и органов должна использовать комплексную фармакотерапию, способную подавлять множественные патофизиологические события, возникающие в этих ус-

ловиях. Однако такой подход требует знания о полной структуре и сравнительной роли различных сигнальных протекторных систем, лежащих в основе толерантности клеток организма к ишемии/гипоксии.

Острый воспалительный ответ рассматривается как механизм врожденного иммунитета, который направлен на защиту организма от повреждающих воздействий. Однако при хроническом воспалении макрофаги иммунной системы выделяют в области повреждения токсические вещества, включающие провоспалительные цитокины и свободные радикалы кислорода, которые приводят к разрушению клеток в поврежденной области мозга. Для прерывания такого хронического воспалительного процесса в разных тканях организма существуют разные механизмы регуляции воспалительного ответа, ключевую роль в которых играют антивоспалительные цитокины, обладающие одновременно иммуномодулирующими, анти-воспалительными и трофическими функциями (Asadullan et al., 2003; Marchetti, Abbracchio, 2005). Используемые в настоящее время в клинике стероидные и нестероидные противовоспалительные препараты имеют ряд существенных недостатков при лечении нейродегенеративных заболеваний мозга. Так, такие стероидные препараты, как гюкокортикоиды, при их хроническом применении сами по себе оказывают повреждающее действие на нейроны и нарушают когнитивные функции мозга (Michaud et al., 2009). Нестероидные противо-воспалительные препараты также имеют ряд существенных недостатков при лечении нейродегенеративных заболеваний мозга. Большинство препаратов этой группы являются неселективными ингибиторами фермента циклооксигеназы, отвечающего за выработку простагландинов и тромбоксана из арахидоновой кислоты. В свою очередь, простагландины оказывают провоспалительное действие. Поскольку патогенетические механизмы нейродегенеративных заболеваний мозга имеют мультифакторный характер, то узконаправленный механизм действия этих препаратов далеко не всегда способен устранять последствия хронического воспалительного процесса. Кроме того, препараты этой группы имеют ряд побочных нежелательных эффектов, прежде всего на сердечно-сосудистую систему, желудочно-кишечный тракт и ряд других органов. В связи с этим можно полагать, что в качестве перспективных нейропротектирующих веществ могут быть использованы антивоспалительные цитокины, которые активируют множественные протектирующие внутриклеточные сигнальные каскады как на уровне транскрипции генов, так и на посттрансляционном уровне. На сегодняшний день одним из перспективных подходов для разработки нового класса нейропротекторов может быть использование таких эндогенных антивоспалительных цитокинов, как интерлейкин-10 (ИЛ-10) и трансформирующий фактор роста – β, обладающих одновременно иммуномодулирующими, антивоспалительными и трофическими свойствами (Asadullan et al., 2003). Поэтому исследование механизмов нейропротектирующего действия на мозг антивоспалительных цитокинов имеет важное социально-ориентированное значение для разработки нового класса лекарственных препаратов, устраняющих или задерживающих развитие нейродегенеративных процессов, в частности при гипоксии или ишемии.

В рамках фундаментальной проблемы нейробиологии, связанной с анализом механизмов взаимодействия нейронов мозга и клеток иммунной системы, целью

работы по программе ФНМ РАН было, с одной стороны, оценить возможность антивоспалительного цитокина ИЛ-10 оказывать нейропротектирующее действие на повреждение нейронов мозга при действии гипоксии или ишемии, а с другой – выяснить роль различных клеточных механизмов функционирования нервных клеток, через которые ИЛ-10 способен оказывать свои нейропротектирующие эффекты. В работе использовались модели гипоксической или ишемической нейродегенерации нейронов гиппокампа – структуры мозга, играющей ключевую роль в когнитивных функциях мозга, а также в патогенезе таких заболеваний, как эпилепсии или болезнь Альцгеймера.

2. Нейропротектирующее действие ИЛ-10 на разных моделях гипоксии и ишемии *in vitro* и *in vivo*

Анализ действия ИЛ-10 на индуцируемые гипоксией или ишемией нарушения активности пирамидных нейронов поля CA1 в переживающих срезах гиппокампа мозга крысы показал, что этот цитокин в концентрации 1 нг/мл оказывает протектирующий эффект (Levin, Godukhin, 2011; Tukhovskaya et al., 2014). Нейропротектирующее действие ИЛ-10 проявлялось уже через несколько минут после его приложения к срезам гиппокампа. В концентрации 10 нг/мл нейропротектирующий эффект ИЛ-10 был менее выраженным. ИЛ-10 в концентации 1 нг/мл устранял также индуцируемую гипоксией или ишемией гибель нейронов и астроцитов в первичной культуре клеток гиппокампа (Turovsky et al., 2013; Tukhovskaya et al., 2014). Анализ нейропротектирующего действия ИЛ-10 на модели ишемии *in vivo* с помощью перманентной окклюзии срединной артерии мозга крысы продемонстрировал, что внутривенное введение ИЛ-10 в дозе 5 мкг/200 мкл через 60 минут после начала окклюзии средней мозговой артерии достоверно снижает объем инфаркта головного мозга примерно в два раза относительно объема инфаркта мозга крыс, которым вместо ИЛ-10 вводили 0,9-процентный раствор NaCl (Tukhovskaya et al., 2014). Эти результаты подтверждают ранее полученные данные о том, что повышенная экспрессия ИЛ-10 у мышей облегчает их сопротивляемость к ишемии (De Bilbao et al., 2009). Все эти результаты указывают на наличие нейропротектирующего действия антивоспалительного цитокина ИЛ-10 на повреждения нейронов мозга, индуцируемых гипоксией или ишемией.

3. Клеточно-молекулярные механизмы, лежащие в основе быстрого нейропротектирующего действия ИЛ-10 на мозг

Канонические сигнальные внутриклеточные пути, через которые ИЛ-10 опосредует свое действие на клетки, связаны с активацией Jak/Stat, PI3 киназа/Akt, MEK/ERK и NF-kB сигнальных путей, что, в свою очередь, приводит к активации генов, продукты которых, с одной стороны, ингибируют апоптоз, а с другой – стимулируют протектирующие механизмы клеток организма (Strle et al., 2001). Моду-

лирующие эффекты ИЛ-10, опосредованные этой цепочкой событий, развиваются с большой задержкой и требуют для своей реализации несколько часов или суток. Однако наши нижеприводимые экспериментальные результаты, а также, современные литературные данные (Beattie et al., 2002; Stellwagen et al., 2005; Schafers, Sorkin, 2008) показывают, что, в отличие от канонических представлений о действии цитокинов, влияние этих медиаторов иммунной системы на активность нейронов может наблюдаться уже в течение нескольких минут после их приложения к мембране нервных клеток (быстрые модулирующие эффекты). В связи с этими новыми представлениями целью нашей работы по программе ФНМ было исследование роли различных типов K^+-каналов, внутриклеточного Ca^{2+}, Ca^{2+}/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II и AMPA рецепторов основного возбуждающего нейромедиатора мозга глутамата в модулирующих эффектах ИЛ-10.

3.1. Роль функциональной активности кальций-зависимых калиевых каналов большой проводимости и фоновых 2P калиевых каналов в нейропротектирующем действии ИЛ-10

Известно, что АТФ-зависимые калиевые каналы, Ca^{2+}-активируемые калиевые каналы и фоновые 2P калиевые каналы являются одними из основных мишеней действия гипоксии, через которые она влияет на возбудимость нервных клеток (Plant et al., 2002; Kulik et al., 2002; Gao, Fung, 2002; Левин, Годухин, 2009; Levin, Godukhin, 2009; Левин и др., 2012). Таким образом, эти калиевые каналы могут быть потенциальными мишенями, через которые ИЛ-10 оказывает свое нейромодулирующее антигипоксическое действие на индуцируемые гипоксией нарушения в активности нейронов мозга. Проверка этого предположения показала следующее. Использовался метод регистрации популяционных спайков от пирамидных нейронов поля CA1 в срезах гиппокампа мозга крысы до, во время и после предъявления кратковременных эпизодов гипоксии. С помощью селективного блокатора BK_{Ca} калиевых каналов иберiотоксина и неселективных блокатора и активатора 2P калиевых каналов, соответственно, бупивакаина и рилузола, оценивалось участие этих каналов в механизмах угнетающего действия ИЛ-10 (1 нг/мл) на способность кратковременных эпизодов гипоксии устранять активность нейронов во время гипоксии и индуцировать у них развитие постгипоксической гипервозбудимости. Результаты исследований показали, что BK_{Ca} калиевые каналы принимают важное участие в механизмах устраняющего действия ИЛ-10 как на способность гипоксии угнетать активность пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа во время эпизода гипоксии, так и на развитие в этих нейронах постгипоксической гипервозбудимости. Получены также предварительные данные о том, что фоновые 2P калиевые каналы могут участвовать в механизмах антигипоксического действия ИЛ-10 на индуцируемое гипоксией угнетение активности пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа непосредственно во время эпизода гипоксии. Таким образом, результаты исследований по проекту позволили получить принципиально новые данные о роли этих двух типов мембранных калиевых каналов в механизмах нейропротекти-

рующего действия антивоспалительного цитокина ИЛ-10 при нарушениях активности нейронов мозга, индуцируемых гипоксией.

3.2. Модулирующее действие ИЛ-10 на внутриклеточные Ca^{2+}-ответы при индуцируемом гипоксией или ишемией повреждении культивируемых клеток гиппокампа

В этих исследованиях были использованы *in vitro* модели гипоксии и ишемии на первичной культуре нейронов гиппокампа и кальциевый зонд Fura-2M для оценки внутриклеточного Ca^{2+}-ответа. Анализ влияния ИЛ-10 (1 нг/мл) на Ca^{2+}-ответ, вызванный сопряженным приложением к культивируемым нейронам гиппокампа агониста возбуждающих глутаматных рецепторов NMDA и кратковременных эпизодов гипоксии, выявил, что данный антивоспалительный цитокин устраняет высвобождение Ca^{2+} из инозитолтрифосфат-зависимых участков эндоплпзматического ретикулума (Turovskaya et al., 2012). Этот нейромодулирущий эффект ИЛ-10 развивался быстро в течение нескольких десятков минут и устранял индуцируемую гипоксией гибель ГАМКергических нейронов в первичной культуре клеток гиппокампа (Turovsky et al., 2013). Таким образом, мишенью действия ИЛ-10 являются инозитолтрифосфат-, но не рианодин-зависимые участки высвобождения Ca^{2+} из эндоплпзматического ретикулума нейронов в первичной культуре клеток гиппокампа мозга крысы при гипоксических условиях. Анализ влияния ИЛ-10 на вызванную *in vitro* ишемией гибель культивируемых клеток гиппокампа обнаружил, что в концентрации 1 нг/мл этот антивоспалительный цитокин снижает амплитуду внутриклеточного Ca^{2+}-ответа и перестраивает структуру самого ответа на фоне ишемии, что приводит к достоверному снижению числа мертвых астроцитов и нейронов в первичной культуре клеток гиппокампа (Tukhovskaya et al., 2014). Нейропротектирующее действие ИЛ-10 развивалось через 15 минут и достигало максимального эффекта через 24 часа после его приложения к культивируемым клеткам гиппокампа. Таким образом, результаты этих исследований позволили получить принципиально новые данные о роли внутриклеточных депо ионов кальция в механизмах нейропротектирующего действия антивоспалительного цитокина ИЛ-10 при повреждениях нейронов мозга, индуцируемых гипоксией и ишемией.

3.3. ИЛ-10 восстанавливает вызванное гипоксией угнетение экспрессии альфа-субъединицы Ca^{2+}/кальмодулин-зависимой протеинкиназы

Целью этих исследований было оценить действие ИЛ-10 на вызванные кратковременными эпизодами гипоксии нарушения в экспрессии α- и β-субъединицы Ca^{2+}/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMKII) в переживающих срезах гиппокампа мозга крысы. Экспрессию субъединиц CaMKII оценивали с помощью специфических антител методом Вестерн-блоттинга в гомогенатах срезов гиппокампа.

Уже через 10 минут после окончания эпизодов гипоксии на фоне ИЛ-10 (1 нг/мл) наблюдалось восстановление вызванного эпизодами гипоксии снижения экспрессии α-субъединицы CaMKII до значений, наблюдаемых в срезах гиппокампа без гипоксических воздействий (Savina et al., 2013). Таким образом, ИЛ-10 способен восстанавливать вызванное гипоксией угнетение экспрессии α-субъединицы Ca^{2+}/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II, что свидетельствует о гомеостатической нейромодулирующей функции этого антивоспалительного цитокина.

3.4. ИЛ-10 восстанавливает вызванное гипоксией угнетение экспрессии GluA1-субъединицы AMPA рецепторов глутумата

Дальнейшей целью наших исследований было оценить действие ИЛ-10 на вызванные кратковременными эпизодами гипоксии нарушения в экспрессии GluA1-субъединицы AMPA-рецепторов глутамата, играющих ключевую роль в передаче возбуждающего сигнала в глутаматных синапсах мозга. Популяционные спайки регистрировали в поле CA1 срезов гиппокампа мозга крысы до, во время и после действия кратковременных эпизодов гипоксии. Экспрессию GluA1-субъединицы AMPA-рецепторов оценивали с помощью специфических антител методом Вестерн-блоттинга в гомогенатах срезов гиппокампа. Через несколько минут после окончания эпизодов гипоксии на фоне ИЛ-10 (1 нг/мл) наблюдалось восстанавление уровня экспрессии GluA1-субъединицы AMPA-рецепторов, сниженного после эпизодов гипоксии, до значений, наблюдаемых в срезах гиппокампа без гипоксических воздействий (Savina et al., 2013). Эти результаты указывают на существование нового неканонического механизма, посредством которого антивоспалительный цитокин ИЛ-10 способен оказывать быстрые модулирующие действия на активность нейронов, предохраняющие индуцируемые гипоксией нарушения в этой активности.

4. Заключение

Известно, что такие медиаторы иммунной системы, как антивоспалительные цитокины, продуцируются резидентными клетками мозга, прежде всего микроглией и астроцитами, при нормальных физиологических условиях (Szelenyl, 2001). Однако при повреждениях мозга, связанных с нейрологическими заболеваниями, механической травмой, гипоксией/ишемией или инфекциями, экспрессия антивоспалительных цитокинов резко возрастает. Современные экспериментальные и клинические наблюдения указывают на их протектирующее действие в отношении повреждения нейронов в ответ на стрессовые (потенциально летальные) стимулы (Strle et al., 2001; Zhou et al, 2009; DeBilbao et al., 2009). Связывание антивоспалительного цитокина ИЛ-10 с его мембранным рецептором приводит к активации нескольких канонических внутриклеточных сигнальных путей, включающих: Jak/Stat, MEK/ERK и PI3 киназа/Akt (Strle et al., 2001). Экспериментальные данные показывают, что ИЛ-10 через стимуляцию Jak/Stat сигнального пути способен

регулировать активность PI3 киназа/Akt, MEK/ERK и фактор транскрипции NF-kB, что, в свою очередь, приводит к активации генов, продукты которых, с одной стороны, ингибируют апоптоз, а с другой – стимулируют протектирующие механизмы клеток организма (Strle et al., 2001; Leker, Shohami, 2002). Модулирующие эффекты ИЛ-10, опосредованные этой цепочкой событий, развиваются с большой задержкой и требуют для своей реализации несколько часов – суток. Однако эти экспериментальные данные оказались неполными. Относительно недавно было показано, что в центральной нервной системе позвоночных такие сигнальные молекулы, как цитокины, наряду с их ролью в регуляции иммунного ответа и воспаления способны также модулировать возбудимость нервных клеток через лиганд- и потенциал-зависимые мембранные каналы, синаптическую передачу и нейрональную пластичность. Причем, в отличие от классических представлений о действии цитокинов, влияние этих медиаторов иммунной системы на активность нейронов может наблюдаться уже в течение нескольких минут после их приложения к мембране нервных клеток (быстрые эффекты) (Beattie et al., 2002; Viviani et al., 2003; Stellwagen et al., 2005; Schaffers, Sorkin, 2008; Turovskaya et al., 2012; Savina et al., 2013; Turovsky et al., 2013).

Результаты проведенных нами исследований позволили получить принципиально новые данные о роли кальций-зависимых калиевых каналов, фоновых 2P калиевых каналов (предварительные результаты), внутриклеточных депо ионов кальция, Ca^{2+}/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II и ионотропных рецепторов глутамата в механизмах быстрого модулирующего действия антивоспалительного цитокина ИЛ-10, через которые данный цитокин способен оказывать нейропротектирующие действия на повреждения клеток мозга, индуцируемых гипоксией или ишемией.

На рисунке представлена принципиальная схема пирамидного нейрона поля CA1 гиппокампа с клеточными мишенями (показаны крупными стрелками) модулирующего действия ИЛ-10 по результатам наших исследований. Гипоксия или ишемия способны инициировать три группы событий в этих нейронах: уменьшать вероятность генерации потенциалов действия, инициировать трансформацию одиночного потенциала действия в пачки потенциалов действия и приводить к гибели этих нейронов. Антивоспалительный цитокин ИЛ-10, модулируя соответствующие клеточные мишени, оказывает нейропротектирующее действие на индуцируемые гипоксией или ишемией нарушения в их активности.

Современные клинические данные и результаты экспериментальных исследований на животных показывают, что центральная роль в развитии нейродегенеративных процессов при ишемии/гипоксии, механической травме, эпилепсиях, а также при таких нейродегенеративных заболеваниях мозга, как болезнь Альцгеймера или болезнь Паркинсона, принадлежит провоспалительным цитокинам. В связи с этим одним из перспективных подходов для разработки нового класса нейропротекторов может быть использование эндогенных антивоспалительных цитокинов. Из фундаментальных исследований также известно, что опосредованная глутаматом эксайтотоксичность, а также нарушение гомеостаза ионов кальция являются одними из ключевых детерминантов клеточной гибели при этих нейро-

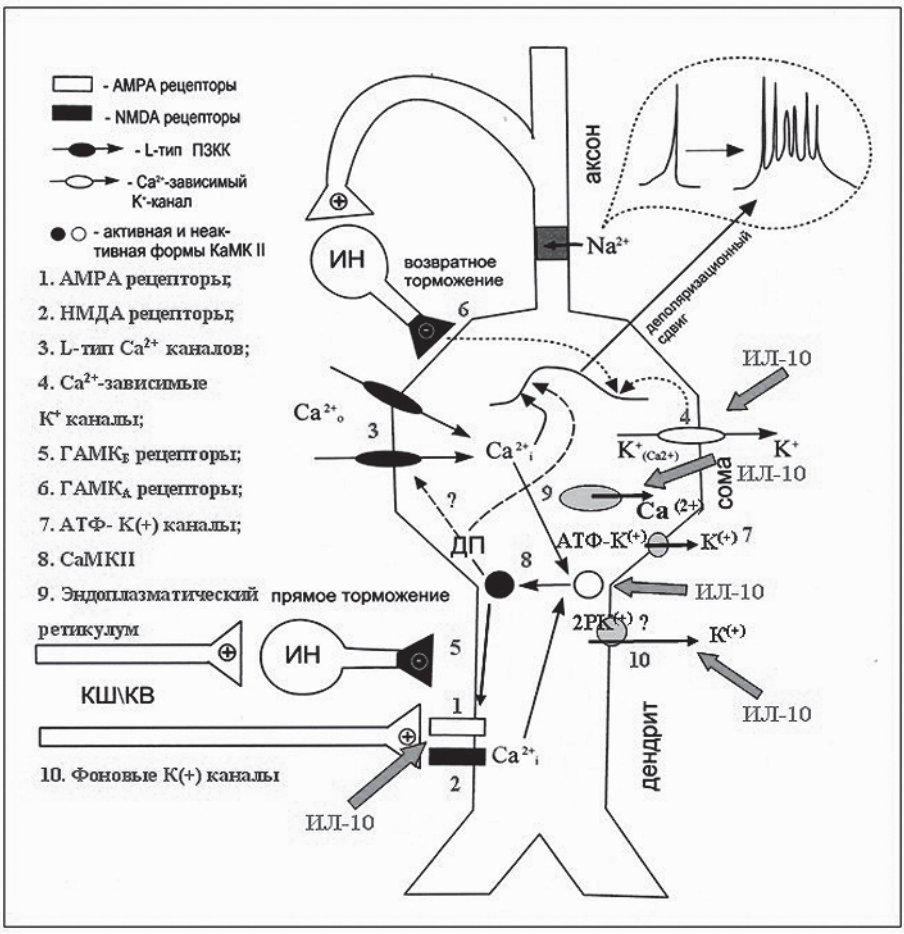


Рис. Принципиальная схема пирамидного нейрона поля CA1 гиппокампа с клеточными мишенями (показаны крупными стрелками) модулирующего действия ИЛ-10 по результатам проведенных нами исследований

1 – AMPA рецепторы; 2 – NMDA рецепторы; 3 – L-тип Ca^{2+} каналов; 4 – Ca^{2+}-зависимые K^+-каналы; 5 – $ГАМК_Б$ рецепторы; 6 – $ГАМК_А$ рецепторы; 7 – АТР-K^+ -АТФ-зависимые K^+ каналы; 8 – КаМК II – Ca^{2+}/кальмодулин-зависимая протеинкиназа II; 9 – Инозитолтрифосфат-зависимые участки эндоплазматического ретикулума; 10 – фоновые 2P калиевые каналы. ДП – долговременная потенциация

патологиях. Результаты представленных нами исследований позволили показать на разных моделях ишемии *in vivo* и *in vitro*, а также на *in vitro* моделях гипоксии, что антивоспалительный цитокин ИЛ-10 оказывает нейропротектирующее действие на повреждение нейронов мозга, индуцируемых ишемией или гипоксией. Кроме того, полученные результаты позволили получить принципиально-новые представления о роли различных мембранных калиевых каналов, внутриклеточных депо ионов кальция, Ca^{2+}/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II и ионотропных рецепторов глутамата в механизмах нейропротектирующего действия ИЛ-10 на повреждения нейронов мозга, индуцируемых гипоксией или ишемией. Тем не менее,

необходимо продолжить исследования по анализу механизмов этого действия антивоспалительных цитокинов. Одним из перспективных подходов для разработки нового класса нейропротекторов может быть использование активаторов стимулируемых ИЛ-10 протектирующих внутриклеточных сигнальных каскадов, способных блокировать сигнальные каскады гибели клеток мозга. Из литературных данных известно, что в клетках иммунной системы активируемый ИЛ-10 PI3 киназа/Akt внутриклеточный сигнальный каскад является одним из ключевых каскадов, опосредующих активацию генов, продукты которых, с одной стороны, ингибируют апоптоз, а с другой – стимулируют протектирующие механизмы клеток. Однако нейропротектирующая роль этого сигнального каскада в клетках мозга остается неясной. Поэтому исследования в этом направлении могут дать новые, имеющие практическое значение для медицины, представления о роли и механизмах нейропротектирующего действия антивоспалительных цитокинов как на индуцируемые ишемией или гипоксией повреждения нейронов мозга, так и на патогенез таких нейродегенеративных заболеваний мозга как болезни Альцгеймера или Паркинсона и как следствие – разработать на основе этих знаний новые лекарственные препараты.

Литература

Левин С.Г., Годухин О.В. Роль Ca^{2+}-активируемых калиевых каналов большой проводимости в прекондиционирующих эффектах гипоксии и постгипоксической гипервозбудимости нейронов поля CA1 гиппокампа *in vitro* // ЖВНД. 2009. Вып. 59. № 5. С. 622-629.

Левин С.Г., Шамсутдинова А.А., Годухин О.В. Сравнительное действие блокаторов АТФ-чувствительных K^+-каналов на индуцируемые кратковременными эпизодами гипоксии изменения активности пирамидных нейронов поля CA1 срезов гиппокампа // Бюлл. эксперим. биол. и медицины. 2012. Вып. 154. № 10. С. 435-438.

Левин С.Г., Конаков М.В., Годухин О.В. К механизмам действия интерлейкина-10 на индуцируемые гипоксией изменения в активности нейронов гиппокампа: возможная роль 2P калиевых каналов. // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Ред. В.П. Зинченко, А.В. Бережнов. Пущино: Ема, 2013. Т. 2. С. 457-461.

Asadullan K., Sterry W., Volk H.D. Interleukin-10 therapy – review of a new approach // Pharmacol. Rev. 2003. Vol. 55. № 2. P. 241-269.

Beattie E.C., Stellwagen D., Morishita W. et al. Control of synaptic strength by glial TNFα // Science. 2002. Vol. 295. P. 2282-2285.

De Bilbao F., Arsenijevic D., Moll T. et al. In vivo over-expression of interleukin-10 increases resistance to focal brain ischemia in mice // J. Neurochem. 2009. Vol. 110. P. 12-22.

Gao T.M., Fung M.L. Decreased large conductance $Ca^{(2+)}$-activated $K^{(+)}$ channel activity in dissociated CA1 hippocampal neurons in rats exposed to perinatal and postnatal hypoxia // Neurosci. Lett. 2002. Vol. 332. № 3. P. 163-166.

Harukuni I., Bhardwaj A. Mechanisms of brain injury after global cerebral ischemia // Neurol. Clin. 2006. Vol. 24. P. 1-21.

Kulik A., Brockhaus J., Pedarzani P., Ballanyi K. Chemical anoxia activates ATP-sensitive and blocks Ca^{2+}-dependent K^+ channels in rat dorsal vagal neurons in situ // Neuroscience. 2002. Vol. 110. № 3. P. 541-54.

Leker R.R., Shohami E. Cerebral ischemia and trauma – different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities // Brain Res. Rev. 2002. Vol. 39. P. 55-73.

Levin S.G., Godukhin O.V. Comparative roles of ATP-sensitive K^+ channels and Ca^{2+}-activated BK^+ channels in posthypoxic hyperexcitability and rapid hypoxic preconditioning in hippocampal CA1 pyramidal neurons *in vitro* // Neurosci. Lett. 2009. Vol. 461. P. 90-94.

Levin S.G., *Godukhin O.V.* Anti-inflammatory cytokines, TGF-β1 and IL-10, exert anti-hypoxic action and abolish posthypoxic hyperexcitability in hippocampal slice neurons: Comparative aspects // Exper. Neurology. 2011. Vol. 232. P. 329-332.

Marchetti B., Abbracchio M.P. To be or not to be (inflamed) – is that the question in anti-inflammatory drug therapy of neurodegenerative disorders? // Trends in Pharmac. Sci. 2005. Vol. 26. № 10. P. 517-525.

Martin L.J. The apoptosis – necrosis cell death continuum in the CNS development, injury and disease: contribution and mechanisms // Neuroprotection. Eds E.N. Lo, J. Marwah. USA, Prominenet Press, 2002, P. 380-412.

Mehta S.L., Manchas N., Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics // Brain Res. Rev. 2007. Vol. 54. P. 34-66.

Michaud K., Forget H., Cohen H. Chronic glucocorticoid hypersecretion in Cushing's syndrome exacerbates cognitive aging // Brain and Cognition. 2009. Vol. 71. P. 1-8.

Nixon R.A. The role of autophagy in neurodegenerative disease // Nature Medicine 2013. Vol. 19. P. 983-997. doi:10.1038/nm.3232.

Obrenovitch T.P. Molecular physiology and preconditioning-induced brain tolerance to ischemia // Physiol. Rev. 2008. Vol. 88. P. 211-247.

Plant L.D., Kemp P.J., Peers D.C., Henderson Z., Pearson H.A. Hypoxic depolarization of cerebellar granule neurons by specific inhibition of TASK-1 // Stroke. 2002. Vol. 33. P. 2324-2328.

Puyal J., Ginet V., Peter G.H. Clarke P.G.H. Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity 3 and ischemic brain damage: A challenge for neuroprotection // Progress in Neurobiology. 2013. dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.03.002.

Savina T.A., Shchipakina T.G., Levin S.G., Godukhin O.V. Interleukin-10 prevents the hypoxia-induced decreases in expressions of AMPA receptor subunit GluA1 and alpha subunit of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II in hippocampal neurons // Neurosci. Lett. 2013. Vol. 534. P. 279-284.

Schaffers M., Sorkin L. Effect of cytokines on neuronal excitability // Neurosci. Lett. 2008. Vol. 437. P. 188-193.

Stankowski J.N., Gupta R. Therapeutic targets for neuroprotection in acute ischemic stroke: lost of translation? // Antioxidants and Redox Signaling. 2011. Vol. 14. № 10. P. 1841-1851.

Stellwagen D., Beattie E.C., Seo J.Y., Malenka R.C. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-α // J. Neurosci. 2005. Vol. 25. № 12. P. 3219-3228.

Strle K., Zhou J.H., Shen W.H. et al. Interleukin-10 in the brain // Crit. Rev. Immunol. 2001. Vol. 21. № 5. P. 427-449.

Szelenyl J. Cytokines and the central nervous system // Brain Res. Bulletin. 2001. Vol. 54. № 4. P. 329-338.

Tian L., Ma L., Kaarela T., Li Z. Neuroimmune crosstalk in the central nervous system and its significance for neurological diseases // J. Neuroinflam. 2012. Vol. 9. P. 1-10.

Tukhovskaya E.A., Turovsky E.A., Turovskaya M.V. et al. Interleukin-10 increases resistance to brain ischemia through modulation of ischemia-induced intracellular Ca^{2+} response // Neurosci. Lett. 2014. Vol. 571. P. 55-60.

Turovskaya M.V., Turovsky E.A., Zinchenko V.P., Levin S.G., Godukhin O.V. Interleukin-10 modulates [Ca2+] i response induced by repeated NMDA receptor activation with brief hypoxia through inhibition of InsP3-sensitive internal stores in hippocampal neurons // Neurosci. Lett. 2012. Vol. 516. № 1. P. 151-155.

Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Kononov A.V., Zinchenko V.P. Short-term episodes of hypoxia induce posthypoxic hyperexcitability and selective death of GABAergic hippocampal neurons // Experim. Neurol. 2013. Vol. 250. P. 1-7.

Vezzani A., Aronica E., Mazarati A., Pitman Q.J. Epilepsy and brain inflammation // Exper. Neurology. 2013. Vol. 244. P. 11-21.

Viviani B., Bartesaghi S., Gardoni F. et al. Interleukin-1b enchances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increases through activation of the Src family of kinases // J. Neurosci. 2003. Vol. 23. № 25. P. 8692-8700.

Zhou Z., Peng X., Insolera R., Fink D.J., Mata M. Interleukin-10 provides direct trophic support to neurons // J. Neurochem. 2009. Vol. 110. № 5. P. 1617-1627.

Применение аденозинфосфатов для предотвращения молекулярного старения NADH-дегидрогеназы в митохондриях

М.С. Фролова, Н.Л. Векшин

Нейродегенеративные процессы в мозге приводят, в частности, к паркинсонизму. Старческий паркинсонизм с трудом поддается лечению. Применение различных медикаментов помогает на время снять симптомы, но не более того. Например, дофаминовая терапия не позволяет вылечить паркинсонизм. Поэтому необходимы новые подходы, которые могли бы позволить осуществлять эффективное лечение.

Один из путей лечения, на наш взгляд, мог бы заключаться в восстановлении функции стареющих митохондрий. Ведь старение митохондрий может приводить к дегенерации нейронов. Старые митохондрии – постмитохондрии – характеризуются ухудшением работы дыхательной цепи, снижением продукции АТФ, появлением липофусцина (Белякович, 1990).

В последние годы старческое развитие нейромышечных дегенеративных заболеваний все чаще связывают с нарушениями работы NADH-дегидрогеназного комплекса I в митохондриях (Seo et al., 2004; Varghese et al., 2009) и, как следствие, повышенным окислительным стрессом клеток.

Мы предполагаем, что одним из факторов, вызывающим эти нарушения, является потеря связи между FMN и NADH-дегидрогеназой.

FMN находится в 50-кДа субъединице NADH-дегидрогеназы (именно эта субъединица имеет активный центр для связывания NADH). FMN связан с ферментом нековалентно и поэтому при различных воздействиях легко выпадает. Это может происходить спонтанно с течением времени, при небольшом повышении температуры, под действием следовых количеств (0,001%) детергентов и других вредных факторов (Соколова, Векшин, 2008; Векшин, 2009). В результате электроны от NADH не идут далее по электрон-транспортной цепи, а напрямую восстанавливают молекулярный кислород до супероксида. Перепроизводство супероксид-аниона, способного приводить к перекисному окислению липидов, к повреждению белков и ДНК, вызывает неизбежное старение как самих митохондрий, так и других клеточных органелл. В ходе этого может запускаться механизм гибели клетки путем апоптоза или некроза, в зависимости от количества и степени повреждения митохондрий.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что предотвратить потерю связи между NADH-дегидрогеназой и молекулой FMN можно с помощью NAD, который стабилизирует собой фермент (Соколова, Векшин, 2008; Векшин, 2009). Такое действие NAD вызвано, во-первых, тем, что он, являясь продуктом окисления NADH, ингибирует реакцию дегидрирования и, во-вторых, находясь в активном центре, механически стабилизирует активный центр, что препятствует вываливанию FMN.

Сокращения: FAD – флавинадениннуклеотиды; FMN-H_2 – восстановленный флавин.

К сожалению, возможное лечение митохондриальных энцефаломиопатий с использованием NAD затруднительно, так как он плохо проникает в клетки и в сами митохондрии. Кроме того, NAD может тормозить работу NADH-дегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы и других NAD-зависимых ферментов.

Своей задачей в этой работе мы поставили протестировать некоторые природные аналоги NAD на предмет стабилизации FMN в NADH-дегидрогеназе, причем, что особенно важно, без подавления ферментативной активности. Для этого был выбран ряд природных веществ с похожей на NAD химической формулой: ATP, ADP, AMP, аденин, аденозин, никотиновая кислота и никотинамид.

Чтобы увеличить спонтанный выход FMN, изолированные митохондрии инкубировались при температуре 37°C в течение двух часов. Для того чтобы такие вещества, как NAD, NADH, аденин и аденозин, лучше проникали в митохондрии, была выбрана гипотоническая среда инкубации, содержащая 100 мМ сахарозы и 10 мМ Tris-фосфат, pH=7,0. В такой среде митохондриальные мембраны становятся более проницаемыми. Кроме того, митохондрии использовались после однократной заморозки, что способствует некоторой пермеабилизации мембран и лучшему проникновению веществ (но не разрушает самих органелл).

Для определения ферментативной активности NADH-дегидрогеназы был выбран фотометрический метод Беляковича с помощью пара-нитротетразолия фиолетового (p-NTV), восстанавливающегося до формазана, который откладывается в матриксе митохондрий в виде микрокристалликов и не влияет на дальнейшую скорость реакции (Белякович, 1990). Кроме того, этот метод удобен тем, что скорость восстановления p-NTV в десятки раз превосходит скорость передачи электронов по электрон-транспортной цепи на кислород, поэтому можно не использовать блокаторы дыхательной цепи.

Митохондриальную фракцию из печени крыс выделяли в среде, содержащей 20 мМ Tris-HCl и 250 мМ сахарозы (pH=7,7), при температуре 2°C стандартным методом с некоторыми модификациями (Шарова, Векшин, 2004). Сначала центрифугировали исходную общую суспензию на BECKMANJ2-21 при 1000 g в течение 10–15 мин, в результате чего осаждались (и затем отбрасывались) клетки и другие крупные частицы. Супернатант центрифугировали в течение 15 мин при 5000 g, в результате чего осаждались в основном зрелые тяжелые митохондрии, которые затем суспендировали в той же среде (9 мл на 1.5 мл осадка), расфасовывали на льду в пробирки Eppendorf по 1 мл, замораживали и использовали для опытов (после размораживания). В ряде случаев выделение митохондрий производили в среде, содержащей 200 мМ сахарозы, 100 мМ маннит, 10 мМ хепес (pH=7,5), и осуществляли двойную промывку с двукратным центрифугированием при 5000 g.

Ферментативная реакция окисления NADH паранитротетразолием фиолетовым (p-NTV) детектировалась по образованию формазана, откладывающегося внутри митохондрий. В ходе ферментативной реакции окисления NADH молекула p-NTV восстанавливается до формазана, и суспензия митохондрий приобретает из-за него розовую окраску. В этих опытах к суспензии митохондрий из печени крысы добавляли 100 мкМ NADH, 100 мкМ p-NTV и тестируемое вещество (ADP, аденозин и др.) в избытке (до 300 мкМ). Кинетику увеличения оптической плотнос-

ти при образовании формазана измеряли в течение 15 минут на спектрофотометре «ПромЭкоЛаб-5400УФ» (Санкт-Петербург) при 540 нм.

Концентрацию митохондриального белка определяли УФ-экспресс-методом (Векшин, 1988). Все фракции выравнивали по содержанию белка с помощью буфера (100 мМ сахарозы и 10 мМ Tris-фосфат, pH=7,0) до конечной концентрации 0,3 мг/мл.

Спектры флавиновой флуоресценции митохондрий записывали на спектрофлуориметре SLM-4800 (SLM, Inc., США) в 1-сантиметровой или 0,4-сантиметровой кюветах при 20°С. Длина волны возбуждения флавинов была в максимуме полосы поглощения при 450 нм, а длина волны излучения – в максимуме при 525 нм. В ряде опытов, где интенсивность флуоресценции была низкой, в частности – при измерении степени поляризации (*P*) флавиновой флуоресценции, использовали зеркальные кюветы, позволяющие усилить сигнал в несколько раз (Векшин, 2009).

Для обнаружения локализации флавина после 2-часовой инкубации при 37°С раствор митохондрий пропускался через 0,2-микронные миллипоровые фильтры и затем проводилось измерение флуоресценции фильтрата (митохондрии оседали на фильтре). Через такие поры проходят помимо флавинов и флавобелков также протомитохондрии (малые зародышевые незрелые митохондрии), но они почти не содержат флавинов (Зинина, Векшин, 2008; Векшин, 2010). В других измерениях, где митохондрии не мешали измерению флавиновой флуоресценции, они не удалялись из раствора. Все измерения проводились по 5–10 раз на митохондриальных фракциях из разных животных, затем находилось среднеарифметическое значение, которое затем нормировалось на 100%.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что процесс выхода FMN из активного центра NADH-дегидрогеназы может ускоряться некоторыми веществами, в частности – следовыми количествами детергентов, а также небольшим длительным нагреванием. Это согласуется с давно известным фактом полной или частичной утраты FMN в ходе препаративных работ по выделению и очистке изолированной NADH-дегидрогеназы (Galante, Hatefi, 1979; Dooijewaard et al., 1978; Almeida et al., 1999; Cremona, Kerney, 1964; Okun et al., 2000). Причем утрата FMN сопровождается падением NADH:убихинон-редуктазной активности, но не NADH:феррицианид-редуктазной. Это связано с тем, что FMN во второй реакции не участвует (Векшин, 2009; Шарова, Векшин, 2004). Не участвует он и в NADH:тетразолий-редуктазной реакции (Векшин, 2009).

В наших экспериментах по стабилизации флавиновых молекул в ферменте мы инкубировали митохондрии в течение 2 часов при 37°С. После этого при 20°С измеряли флавиновую флуоресценцию ($\lambda_{возб}$=450 нм, $\lambda_{эмисс}$=525 нм). Кроме того, мы измеряли триптофановую флуоресценцию ($\lambda_{возб}$=286 нм, $\lambda_{эмисс}$=340 нм) – для определения выхода из митохондрий белков (большинство белков митохондрий содержат триптофановые остатки) и флуоресценцию 7-амино-актиномицина ($\lambda_{возб}$=530 нм, $\lambda_{эмисс}$=620 нм) – для определения выхода ДНК в раствор (7-амино-актиномицин хорошо встраивается в расплетенные участки ДНК) (Векшин, 2009). Оказалось, что в процессе выхода FMN не происходит никакого выхода белков и ДНК из митохондрий в раствор: интенсивность триптофановой флуоресценции и 7-амино-ак-

тиномициновой флуоресценции в среде после 2-часовой инкубации митохондрий (при 37°С) и их последующего удаления оставалась пренебрежимо малой (данные не приводятся). Это означает, что митохондриальные мембраны остались целыми.

При этом интенсивность флавиновой флуоресценции в контрольных пробах при инкубации возрастала в 2–3 раза (в разных опытах, в зависимости от сохранности митохондрий). Нужно отметить, что вклад в общую флавиновую флуоресценцию митохондриальной суспензии дает не только FMN, принадлежащий NADH-дегидрогеназе, но и флавинадениннуклеотиды (FAD), прочно ковалентно связанные с другими митохондриальными дегидрогеназами. *Изменение* же интенсивности флавиновой флуоресценции обусловлено в основном именно выходом FMN из NADH-дегидрогеназы в раствор (за счет выхода FMN из митохондрий возрастает его коэффициент экстинкции, а значит и флуоресценция). Молекулы FAD митохондриальных флавопротеинов не вносят заметного вклада в изменение флуоресценции, потому что молекулы FAD остаются связанными ковалентно со своими ферментами внутри митохондриальных сфер, рассеивающих падающий на них свет. К тому же, флуоресценция FAD затушена ароматическими аминокислотами и железо-серными кластерами (Векшин, 2009).

Помимо регистрации изменений интенсивности флуоресценции мы измеряли степень поляризации флавиновой флуоресценции, по величине которой можно определить, в каком состоянии находится FMN – связанном или свободном (Векшин, 2009). У связанного флавина степень поляризации высокая (из-за малого времени жизни возбужденного состояния и низкой вращательной подвижности внутри белка). По мере выхода FMN в раствор степень поляризации уменьшается, т.к. в водной фазе резко увеличивается скорость вращения, а также увеличивается время жизни (из-за отсутствия тушения железо-серными кластерами). В наших опытах степень поляризации флавиновой флуоресценции после инкубации при 37°С через 2 часа уменьшалась в 1,5–2 раза.

Для того чтобы проверить, где именно оказался высвобожденный FMN – в митохондриальном матриксе или внешнем растворе – мы измеряли интенсивность и степень поляризации также в фильтратах, полученных путем фильтрации суспензий митохондрий (до и после 2-часовой инкубации) через 0,2-микронные миллипоровые фильтры. Интенсивность флуоресценции в фильтрате увеличивалась после инкубации митохондрий (в сравнении с митохондриями до инкубации) в 4,3 раза. Это составило 94% от общей интенсивности флуоресценции после инкубации. При этом степень поляризации флуоресценции в фильтрате снижалась очень сильно – до 0,06, что соответствует свободному вращению FMN в водной фазе (Векшин, 2009). Полученные данные однозначно говорят о том, что почти весь FMN попадает во внешний раствор, причем в свободном виде. Молекулы FMN, отошедшие в NADH-дегидрогеназе от железо-серных кластеров (которые тушили флуоресценцию FMN) и вышедшие из фермента в матрикс (но не успевшие выйти в наружный раствор), дают в изменение интенсивности небольшой вклад.

Нужно особо подчеркнуть, что в наших опытах изменения флавиновой флуоресценции не связаны с процессами окисления/восстановления флавинов, т.к. двухчасовая инкубация митохондрий в большинстве экспериментов осуществлялась в

отсутствие NADH, сукцината и иных восстановителей или окислителей. Только в одном случае – при использовании NADH в ходе инкубации – имели место одновременно два явления: восстановление FMN до нефлуоресцирующего FMN-H_2 и стабилизация FMN в ферменте. Поскольку восстановленный флавин (FMN-H_2) имеет разрыхляющие орбитали и не стабилен (сразу отдает электроны в дыхательную цепь, на убихинон), то он быстро переходит вновь в свою окисленную флуоресцирующую форму. Таким образом, вряд ли редокс-переходы FMN/FMN-H_2 вносят ощутимый вклад в изменения флавиновой флуоресценции.

Мы протестировали ряд веществ с частично похожей на NAD химической формулой: аденин, аденозин, ATP, ADP, AMP, никотиновая кислота, никотинамид, NAD.

Начнем с аналогов адениловой части кофермента: аденин, аденозин, ATP, ADP, AMP.

При добавлении ATP, ADP или AMP в концентрации 300 мМ к суспензии печеночных митохондрий флавиновая флуоресценция изменялась, соответственно, на 44,8%, 49,4% и 41% меньше по сравнению с контролем (рис. 1, табл. 1). При до-

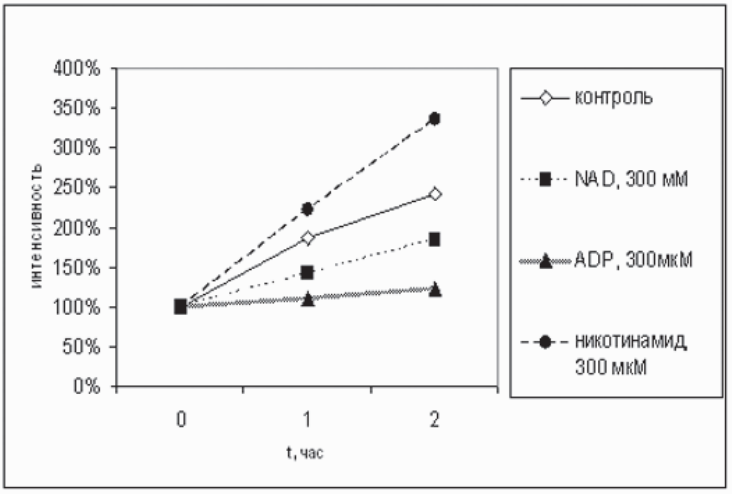


Рис. 1. Влияние аналогов NADH на интенсивность флавиновой флуоресценции в ходе инкубации митохондрий при 37°С. Интенсивность измерена при 20°С

Таблица 1

Влияние NADH и его аналогов (300 мкм) на интенсивность флавиновой флуоресценции (%) в ходе инкубации митохондрий при 37°С

Время	Контроль	Аденин	Аденозин	AMP	ADP	ATP	NAD	NADH	Никотинамид	Никотиновая к-та
Начало	100	100	100	94	99	102	101	101	100	101
Через 1 час	186	203	179	130	110	132	142	160	223	219
Через 2 часа	241	307	256	142	122	133	185	199	336	322

бавлении 300 мкМ AMP к 0,1 мкМ FMN, растворенного в воде (без митохондрий), интенсивность флавиновой флуоресценции не изменялась, т.е. комплексообразование FMN с тестируемыми веществами отсутствовало. Нужно заметить также, что AMP действовал на флавиновую флуоресценцию митохондрий даже в 10-кратно меньшей концентрации – 30 мкМ, причем не хуже, чем 300 мкМ, что говорит о довольно высокой константе связывания этой молекулы с NADH-дегидрогеназой.

Степень поляризации флавиновой флуоресценции при добавлении ATP, ADP и AMP по сравнению с контролем была больше в 2 раза, 1,9 раза и 1,8 раза, соответственно (рис. 2, табл. 2). Это свидетельствует о том, что в присутствии указанных веществ молекулы FMN в основном оставались связанными с молекулами фермента.

Также мы изучали, как влияют указанные вещества на ферментативную реакцию окисления NADH. На рис. 3 показана кинетика NADH-тетразолиевой реакции в течение 15 минут. Видно, что сильных отклонений от хода реакции по сравнению с контролем практически нет. Причем AMP даже ускорял реакцию. Следовательно, можно сделать вывод, что данные вещества (ATP, ADP и AMP) не подавляют фер-

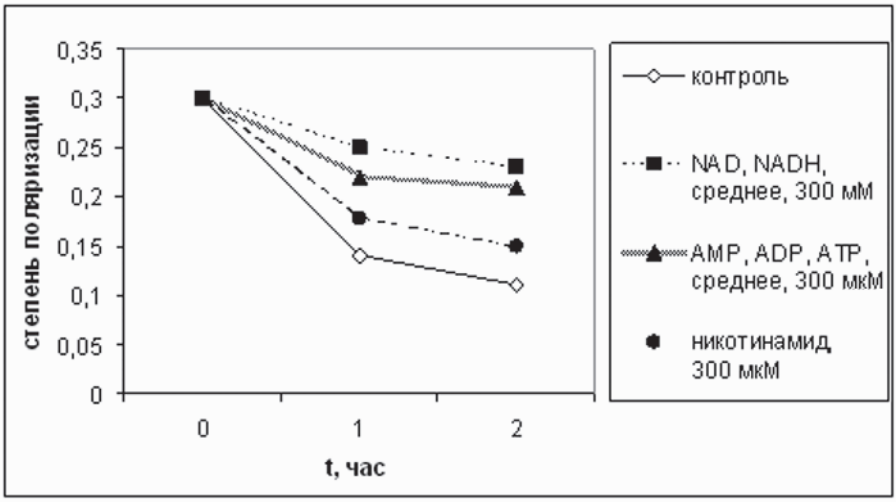


Рис. 2. Влияние аналогов NADH на степень поляризации флавиновой флуоресценции в ходе инкубации митохондрий при 37°C. Поляризация измерена при 20°C

Таблица 2

Влияние NADH и его аналогов (300 мкМ) на степень поляризации флавиновой флуоресценции митохондрий в ходе их инкубации при 37°C

Время	контроль	аденин	аденозин	AMP	ADP	ATP	NAD	NADH	никотинамид	никотиновая к-та
Начало	0,3	0,3	0,36	0,32	0,29	0,29	0,31	0,3	0,3	0,29
Через 1 час	0,14	0,2	0,24	0,21	0,22	0,23	0,27	0,23	0,18	0,18
Через 2 часа	0,11	0,18	0,2	0,2	0,21	0,22	0,25	0,21	0,15	0,12

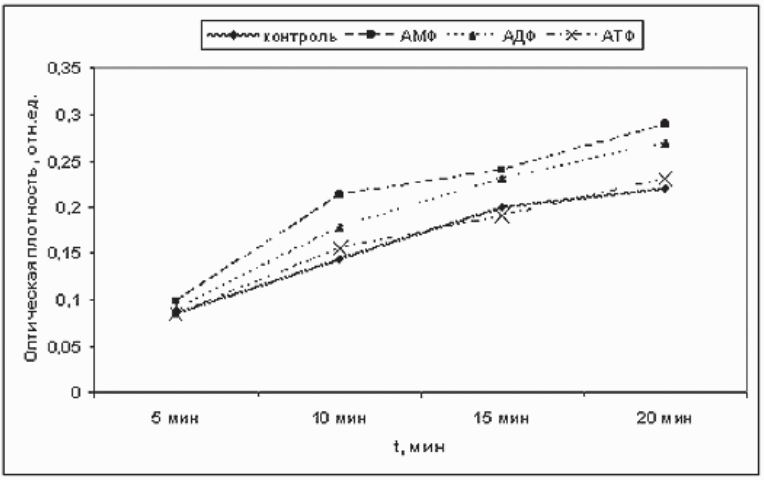


Рис. 3. Действие адениловых нуклеотидов на реакцию восстановления пара-нитратетразолия p-NTV. Температура 20°C

Таблица 3

Скорость ферментативного окисления NADH с помощью p-NTV, измеренная по оптической плотности (D) образующегося формазана в присутствии 300 мкМ тестируемых веществ

Вещество	D, 5 мин	D, 10 мин	D, 15 мин
контроль	0,14	0,22	0,29
аденин	0,13	0,2	0,28
аденозин	0,13	0,2	0,28
AMP	0,16	0,26	0,37
ADP	0,14	0,22	0,31
ATP	0,17	0,26	0,35
NAD (2 мМ)	0,06	0,07	0,08
никотиновая к-та	0,14	0,2	0,26
никотинамид	0,16	0,23	0,28

ментативную активность NADH-дегидрогеназы (табл. 3). В использованных концентрациях они не конкурируют с NADH за активный центр.

При добавлении аденина или аденозина в концентрации 300 мкМ к суспензии печеночных митохондрий изменения флавиновой флуоресценции и степени поляризации флавинов (см. табл. 1, 2) по сравнению с контролем были мало выражены. И эти вещества не влияли на ферментативную активность NADH-дегидрогеназы (см. табл. 3).

Вторая группа аналогов NADH включает в себя никотиновую часть молекулы. Мы протестировали такие вещества, как NAD, NADH, никотиновую кислоту и никотинамид. Из табл. 1 видно, что NAD и NADH препятствуют выходу молекулы FMN, но не настолько хорошо, как AMP, ADP или ATP.

NAD в большой концентрации (2 мМ) успешно конкурирует с NADH за активный центр. Поэтому он полностью ингибирует процесс образования формазана. А в концентрации 300 мкМ он снижает реакцию лишь на 20% (см. табл. 3).

Ряд исследователей (Гривенникова, Виноградов, 2003; Vinogradov, 1998; Grivennikova, Vinogradov, 2006; Albracht et al., 1997) утверждают, что в NADH-дегидрогеназе есть два центра связывания (рис. 4). Предполагается, что в первом происходит окисление NADH, во втором – восстановление NAD. Такие аналоги NAD, как ATP, ADP и AMP, могут связываться со вторым центром, стабилизируя его и механически не давая молекуле FMN выйти из белка в раствор (первый центр занят молекулой NADH или NAD). Несмотря на свой небольшой, по сравнению с NAD, стерический размер, адениловые нуклеотиды в концентрации 300 мкМ не конкурируют за центр связывания с NADH – не ингибируют NADH-тетразолиевую реакцию (см. табл. 3). Интересно, что в случае с AMP эта реакция даже ускоряется (до 30%), что может говорить об аллостерическом регулировании фермента. В присутствии других аналогов скорость данной реакции не отличается от контроля. Очевидно, что адениловые нуклеотиды взаимодействуют либо со вторым центром, либо, что более вероятно, у них есть свой собственный центр связывания с NADH-дегидрогеназой.

Судя по изменениям интенсивности флавиновой флуоресценции, действие NAD меньше на 23% по сравнению с контролем, что в среднем на 21% меньше, чем у ATP, ADP и AMP. Самая высокая степень поляризации флуоресценции FMN в белке наблюдается в присутствии NAD – на 13% больше, чем в случае с ATP (при концентрациях 300 мкМ).

Нужно отметить, что при измерении интенсивности и степени поляризации флуоресценции флавинов в присутствии NADH необходимо учитывать, что в ис-

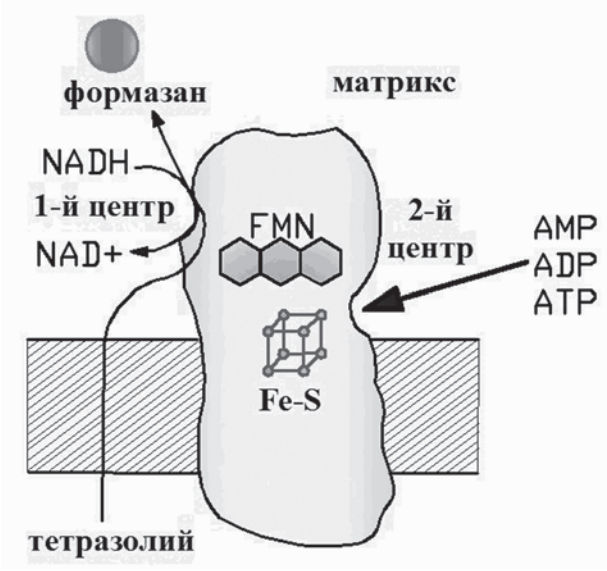


Рис. 4. Фрагмент комплекса I дыхательной цепи митохондрий
Показан путь стабилизации NADH-дегидрогеназы с помощью аденозинфосфатов

пользованной концентрации NADH в воде образует димеры, которые, возбуждаясь при 450 нм, флуоресцируют в той же области, при 525 нм, что и FMN (данные не приводятся). При концентрации 300 мкМ димеры NADH дают вклад около 50% в общую интенсивность. Некоторые исследователи ранее ошибочно принимали флуоресценцию димеров NADH за флавиновую флуоресценцию. За вычетом вклада димеров NADH интенсивность флуоресценции FMN в присутствии NADH на 45% больше по сравнению с контролем. Такая же разница с контролем – у ATP, ADP и AMP, в среднем – 45%.

При добавлении никотинамида или никотиновой кислоты в концентрации 300 мкМ к митохондриям наблюдается увеличение флавиновой флуоресценции на 39% и на 33%, соответственно, по сравнению с контролем. При этом степень поляризации флавиновой флуоресценции в случае применения никотинамида и никотиновой кислоты мало отличаются от контроля. Можно сделать вывод, что эти вещества практически не защищают NADH-дегидрогеназу от потери флавина (см. рис. 1, 2). На реакцию окисления NADH они также не влияют (см. табл. 3).

Подводя итоги, можно заключить, что аденозинфосфаты (ATP, ADP и AMP) способны эффективно препятствовать выходу FMN из NADH-дегидрогеназы, причем не хуже, чем NAD и NADH. Они гидрофильны, хорошо проникают в клетки и митохондрии. Как известно, клетки обычно поддерживают соотношение между ATP и ADP постоянным, а содержание AMP может заметно варьировать. Введение избыточных количеств одного из аденозинфосфатов при лечении не вызовет нарушения их внутриклеточного баланса, но может на время акативировать аденозинфосфат-зависимые ферментативные реакции. Не случайно AMP и ATP применяются в настоящее время в спортивной медицине (Бубнова, 2009), а также для лечения мышечной дистрофии, хронической коронарной недостаточности, дистрофии миокарда. Поэтому в принципе можно начать их доклинические испытания на предмет лечения энцефаломиопатий.

Кроме того, важно будет провести в дальнейшем для лечения и профилактики митохондриального старения и нейродегенеративных заболеваний исследования по поиску и разработке аналогичных *синтетических* препаратов.

Литература

Белякович А.Г. Изучение митохондрий и бактерий с помощью соли тетразолия п-НТФ. Пущино: ОНТИ НЦБИ, 1990. 200 с.

Бубнова Т.В. Разрешенные лекарственные средства и БАД. Пенза: Пензенский гос. ун-т им. В.Г. Белинского, 2009. 36 с.

Векшин Н.Л. Спектрофотометрическое определение количества белка в стандартных биологических суспензиях // Биол. науки. 1988. Vol. 4. P. 107-111.

Векшин Н.Л. Флуоресцентная спектроскопия биополимеров. Пущино: Фотон век, 2009. 176 с.

Векшин Н.Л. Фотометрическое и флуориметрическое изучение протомитохондрий из печени юных и взрослых крыс // Биол. мембраны. 2010. Vol. 27. № 5. P. 424-429.

Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. Митохондриальный комплекс I // Успехи биол. химии. 2003. Vol. 43. P. 19-58.

Зинина А.Н. Векшин Н.Л. Флуориметрическое сравнение протомитохондрий и митохондрий // Биол. мембраны. 2008. Vol. 25. № 6. P. 480-487.

Соколова И.Б., Векшин Н.Л. Потеря флавина НАДН-дегидрогеназным комплексом митохондрий // Биофизика. 2008. Vol. 53. № 1. P. 73-77.

Шарова И.В., Векшин Н.Л. Ротенон-нечувствительное окисление НАДН в митохондриальной суспензии осуществляется НАДН-дегидрогеназой фрагментов дыхательной цепи // Биофизика. 2004. Vol. 49. № 5. P. 814-821.

Albracht S.P.J., Mariette A., DeJong P. Bovine-heart NADH:ubiquinone oxidoreductase is a monomer with 8 Fe-S clusters and 2 FMN groups // Biochim. Biophys. Acta. 1997. Vol. 1318. P. 92-106.

Almeida T., Durante M., Melo, A.M.P., Videira A. The 24-kDa iron-sulphur subunit of complex I is required for enzyme activity // Eur. J. Biochem. 1999. Vol. 265. P. 86-92.

Cremona T., Kerney E.B. Studies on the respiratory chain-linked reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase // J. Biol. Chem. 1964. Vol. 230. № 7. P. 328-333.

Dooijewaard G., Slater E.C., Van Dijk P.J., De Bruin G.J. Chaotropic resolution of high molecular weight (type I) NADH dehydrogenase, and reassociation of flavin-rich (type II) and flavin-poor subunits // Biochim. Biophys. Acta. 1978. Vol. 503. P. 405-424.

Galante Y.M., Hatefi Y. Purification and molecular and enzymic properties of mitochondrial NADH dehydrogenase // Arch. Biochem. Biophys. 1979. Vol. 192. P. 559-568.

Grivennikova V.G., Vinogradov A.D. Generation of superoxide by mitochondrial Complex I // Biochim. Biophys. Acta. 2006. Vol. 1757. P. 553-561.

Okun J.G., Zickermann V., Zwicker K., Schagger H., Brandt U. Binding of detergents and inhibitors to bovine complex I – a novel purification procedure for bovine complex I retaining full ingibitor sensitivity // Biochim. Biophys. Acta. 2000. Vol. 1459. P. 77-87.

Seo B.B., Nakamaru-Ogiso E., Cruz P., Flotte T.R., Yagi T., Matsuno-Yagi A. Functional expression of the single subunit NADH dehydrogenase in mitochondria in vivo: a potential therapy for complex I deficiencies // Hum. Gene. Ther. 2004. Vol. 15. № 9. P. 887-895.

Varghese M., Pandey M., *Samanta A., Gangopadhyay P.K., Mohanakumar K.P.* Reduced NADH coenzyme Q dehydrogenase activity in platelets of Parkinson's disease, but not Parkinson plus patients, from an Indian population // J. Neurol. Sci. 2009. Vol. 279. № 1-2. P. 39-42.

Vinogradov A.D. Catalytic properties of the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I) and pseudo-reversible active/inactive enzyme transition // Biochim. Biophys. Acta.1998. Vol. 1364. P. 169-185.

Репрограммирование соматических клеток: возможности применения для изучения болезней нервной системы и разработки методов лечения

Е.Д. Некрасов, И.В. Честков, М.А. Лагарькова, С.Л. Киселев

Содержание

1. Репрограммирование ядра соматической клетки
2. Генетическое репрограммирование соматических клеток до плюрипотентного состояния
3. Возможности дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в нейроны
4. Использование репрограммирования для изучения и лечения болезней нервной системы
5. Болезнь Паркинсона
6. Болезнь Гентингтона
7. Болезнь Альцгеймера
8. Шизофрения
9. Заключение

1. Репрограммирование ядра соматической клетки

В начале шестидесятых годов XX века существовали различные гипотезы о том, каким образом оплодотворенная яйцеклетка в процессе эмбрионального развития может произвести клетки взрослого организма более чем 200 различных специализированных типов. Было очевидно, что половые клетки сохраняют полный набор генов, но вопрос о сохранении генов в соматических клетках не был столь однозначным. Одна из доминирующих гипотез предполагала, что избыточные гены теряются или необратимо инактивируются, когда клетка становится специализированной (Colman, 2013). Так, например, предполагали, что нейроны теряют гены, ответственные за формирование легкого или, например, производство пищеварительных ферментов. Альтернативная гипотеза заключалась в том, что соматические клетки сохраняют полный набор генов, а за специализацию клеток отвечает их избирательная экспрессия. В 1962 г. Джон Гордон, вдохновленный работами Р. Бриггса и Т.Дж. Кинга (Briggs, King, 1952), показал, что ядро соматической клетки шпорцевой лягушки можно репрограммировать, то есть заставить вести себя, как ядро оплодотворенной яйцеклетки. Для этого он переносил ядра эпителиальных клеток кишечника в энуклеированные ооциты шпорцевой лягушки, которые впоследствии могли развиваться в здоровых головастиков (Gurdon, 1962). Эти экс-

Сокращения: ВКМ – внутренняя клеточная масса; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; aGSK-3β – активная гликогенсинтаза-киназа-3β; APP – белок-предшественник амилоида; GABA – γ-аминомасляная кислота.

перименты показали, что геном, по крайней мере некоторых соматических клеток, может быть переведен в тотипотентное состояние и в цитоплазме яйцеклетки лягушки присутствуют факторы, которые способны это сделать. В 1996 г. был совершен научный прорыв: К.Х. Кэмпбелл и соавторы в Эдинбурге получили двух ягнят переносом ядер из клеток установленной дифференцированной клеточной линии, полученной из девятидневных эмбрионов овец (Campbell et al., 1996). Год спустя эта же технология была успешно использована для клонирования взрослой овцы, в качестве клеток-доноров ядер использовали взрослые клетки молочной железы (Wilmut et al., 1997). Рождение овечки Долли доказало, что клоны млекопитающих могут быть получены из ядер клеток взрослых млекопитающих.

2. Генетическое репрограммирование соматических клеток до плюрипотентного состояния

В 1981 г. двумя группами исследователей было показано, что клетки внутренней клеточной массы (ВКМ) можно изъять из бластоцисты мыши, и в специально подобранных условиях культивирования они способны длительное время пролиферировать *in vitro*, оставаясь при этом плюрипотентными, то есть способными к дифференцировке во все ткани организма, исключая трофобласт (Evans, Kaufman, 1981; Martin, 1981). Такие клетки назвали эмбриональными стволовыми клетками (ЭСК). ЭСК человека были впервые получены в 1998 г. Дж.А. Томсоном и коллегами из избыточных бластоцист, не востребованных в процессе применения вторичных репродуктивных технологий (Thomson et al., 1998).

Важным свойством ЭСК мыши является то, что несмотря на длительное существование в культуре *in vitro* они могут полностью выполнить программу эмбрионального и онтогенетического развития при помещении их обратно в бластоцисту. В химерной мыши производные ЭСК могут присутствовать во всех тканях, включая клетки зародышевого пути. Таким образом, с ЭСК мыши можно проводить генетические манипуляции *in vitro*, а затем получать гетерозиготных или гомозиготных мутантных мышей (Eggan et al., 2001; Misra et al., 2001). За открытие принципов введения специфических генных модификаций в организм мышей посредством эмбриональных стволовых клеток, то есть за изобретение метода нокаута генов, в 2007 г. М. Эвансу, О. Смитису и М. Капеччи (M. Evans, O. Smittis, M. Capetchi) была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине. Развитие технологий полногеномного анализа позволило достаточно точно охарактеризовать транскрипционный профиль генов, экспрессирующихся в различных специализированных клетках, в том числе и в ЭСК.

Целый ряд транскрипционных факторов оказался уникальным для плюрипотентного состояния и, скорее всего, определяли его. Экспериментально это было доказано К. Такахаши и С. Яманака, которые клонировали выбранные гены в ретровирусные векторы и инфицировали ими в различных комбинациях мышиные фибробласты. Были идентифицированы 4 гена транскрипционных факторов: Oct-4, Sox2, c-Myc и Klf4, которые переводят фибробласты в плюрипотентное состояние.

Клетки, полученные таким образом, назвали индуцированными плюрипотентными стволовыми клетками (ИПСК). Результаты этой работы были опубликованы в 2006 г. (Takahashi, Yamanaka, 2006), экспериментальный подход поразил многих ученых, работающих в данной области, как совершенно неожиданный, хотя предпосылки к успеху были – еще в 1987 г. Действительно, Р.Л. Дэвис и соавторы (Davis et al., 1987) показали, что трансгенная экспрессия единственного транскрипционного фактора MyoD может превратить фибробласты в клетки мышц. Получение ИПСК не требует разрушения эмбрионов, что снимает этические проблемы, связанные с применением плюрипотентных стволовых клеток в научных исследованиях и в будущем – в регенеративной медицине.

Уже через год после оригинальной публикации, в 2007 г., С. Яманака успешно получил ИПСК из фибробластов человека с использованием того же набора транскрипционных факторов Oct4, Sox2, c-Myc и Klf4 (Takahashi et al., 2007). Независимой группой Дж.А. Томсона в этом же году были получены ИПСК человека с использованием иного набора транскрипционных факторов: Oct4, Sox2, Nanog и Lin28 (Yu et al., 2007). Дальнейшие исследования продемонстрировали возможность получения ИПСК как от различных млекопитающих: крыс (Li et al., 2009a), макак-резусов (Liu et al., 2008), свиней (Kwon et al., 2013), так и из различных типов соматических клеток: кератиноцитов (Aasen et al., 2008), эндотелиальных клеток (Lagarkova et al., 2010), нейрональных клеток (Eminli et al., 2008), клеток печени и клеток желудка (Aoi et al., 2008), терминально дифференцированных лимфоцитов (Hanna et al., 2008). Эти исследования продемонстрировали универсальность процесса репрограммирования соматических клеток до плюрипотентного состояния с помощью введения в клетки генов транскрипционных факторов.

Целый ряд подходов был разработан для того, чтобы доставлять репрограммирующие факторы в соматические клетки. В первых работах по получению и характеристике ИПСК использовались преимущественно ретровирусные векторы (Stadtfeld, Hochedlinger, 2010), которые встраиваются в геном клетки-хозяина. Было показано, что ретровирусные трансгены перестают экспрессироваться к концу репрограммирования (Stadtfeld et al., 2008), это явление назвали замолканием трансгена, или сайленсингом. Группе С. Яманака впервые удалось репрограммировать соматические клетки до плюрипотентного состояния с помощью плазмид, не интегрирующихся в геном клетки-хозяина, однако эффективность такого репрограммирования оказалась крайне низкой (Okita et al., 2008). Были также продемонстрированы и другие методы репрограммирования соматических клеток до плюрипотентного состояния без интеграции экзогенной ДНК в геном клетки-хозяина: с использованием piggyBac транспозона (Woltjen et al., 2009), синтетической РНК (Warren et al., 2010), аденовирусных векторов (Zhou, Freed, 2009), вируса Сендай (Fusaki et al., 2009), эписомных векторов (Yu et al., 2009), белков (Kim et al., 2009). Поскольку репрограммирование – это, в общем, низкоэффективный процесс, были проведены работы по поиску способов повышения эффективности репрограммирования. Были идентифицированы химические молекулы, которые повышают эффективность репрограммирования (Huangfu et al., 2008; Li et al., 2009b; Shi et al., 2008). Эти молекулы, как правило, оказывают влияние на эпигенетическую машину

клетки и/или способны выполнять функцию некоторых репрограммирующих факторов. Дальнейшее развитие этого подхода позволило в 2013 г. репрограммировать мышиные фибробласты до плюрипотентного состояния с использованием одних только малых химических молекул (Hou et al., 2013). В опубликованной несколько месяцев назад работе Дж. Ханна и коллег было показано, что при ингибировании белка MBD3, который принимает участие в моделировании хроматина, клетки мыши могут быть репрограммированы почти со 100-процентной эффективностью (Rais et al., 2013).

Эквивалентность ИПСК и ЭСК – это сложный и не разрешенный на сегодняшний день вопрос (Hanna et al., 2010). Генетические и эпигенетические отличия между ЭСК и ИПСК могут влиять на процесс дифференцировки, что может привести при дифференцировке к появлению клеток с профилями экспрессии генов и биологическими характеристиками, отличными от клеток, полученных из ЭСК (Hanna et al., 2010). Тесты на способность к дифференцировке считают ключевыми в доказательстве плюрипотентности клеток. Для индуцированных плюрипотентных стволовых клеток мыши в качестве основного теста на способность к дифференцировке обычно используется тест на формирование жизнеспособных химер (Hanna et al., 2010). Недавно методом инъекции диплоидных ИПСК в тетраплоидную бластоцисту (тетраплоидная комплементация) была выращена мышь, организм которой полностью развился из ИПСК, что указывает на эквивалентность некоторых линий ИПСК по своей способности к дифференцировке эмбриональным стволовым клеткам (Zhao et al., 2009). В случае клеток человека исследователям доступны только менее строгие тесты, такие как *in vitro* дифференцировки, формирование тератом при введении иммунодефицитным мышам и способность к образованию эмбриоидных телец. Способность к формированию тератом является необходимым и достаточным тестом для того, чтобы определять клетки человека как плюрипотентные (Hanna et al., 2010).

3. Возможности дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток в нейроны

Плюрипотентные стволовые клетки обладают естественным свойством дифференцироваться во все типы клеток взрослого организма, но важнейшей экспериментальной и биотехнологической задачей является осуществление дифференцировки плюрипотентных клеток *in vitro* в нужном направлении с использованием специальных условий культивирования, биологически активных химических соединений и белковых факторов. За последние годы удалось достичь значительных успехов в дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток человека в специализированные типы человеческих нейронов. Так, например, Л. Ма и коллеги получили до 80% ГАМК-ергических нейронов головного мозга человека в результате направленной дифференцировки (Ma et al., 2012). С. Крикс и соавторы сообщили о получении до 80% дофаминергических нейронов (Kriks et al., 2011) из ИПСК человека. М.В. Аморосо и коллеги получили до 50% мотонейронов человека в ре-

зультате направленной дифференцировки (Amoroso et al., 2013). Также успешно были получены пирамидальные нейроны человека (Espuny-Camacho et al., 2013).

4. Использование репрограммирования для изучения и лечения болезней нервной системы

Технология репрограммирования соматических клеток до плюрипотентного состояния открыла возможность из легкодоступных клеток, таких как, например, фибробласты кожи, получить в лабораторных условиях ИПСК человека, которые, в свою очередь, можно неограниченно наращивать в культуре. Достижения в области направленной дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток человека, в свою очередь, позволяют получать нейроны определенных типов с достаточно высокой эффективностью. Началом применения этих технологий для моделирования заболеваний человека можно считать работу И.Х. Парка и соавторов (Park et al., 2008), в которой было впервые сообщено об успешном получении ИПСК от пациентов с различными наследственными заболеваниями. Особый интерес сразу же привлекли заболевания нервной системы. Для большинства болезней нервной системы эффективные методы терапии пока еще не разработаны, патологический процесс, как правило, мало изучен и имеет крайне сложный механизм, отсутствуют адекватные модельные системы для изучения патогенеза этих заболеваний, а доступ исследователей к нейронам человека, особенно в случае наследственных заболеваний, сильно ограничен. Несмотря на молодость данного направления, уже удалось добиться определенных успехов в моделировании заболеваний нервной системы с помощью ИПСК.

5. Болезнь Паркинсона

Болезнь Паркинсона является вторым по распространенности хроническим прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием после болезни Альцгеймера. Болезнь неизлечима, для нее характерны четыре двигательных нарушения: тремор, гипокинезия, мышечная ригидность, постуральная неустойчивость, а также вегетативные и психические расстройства. Заболевание встречается повсеместно, частота встречаемости колеблется от 60 до 140 человек на 100 000 населения. Как правило, первые симптомы заболевания появляются в 55–60 лет. В ряде случаев болезнь может развиться в возрасте до 40. Мужчины болеют несколько чаще, чем женщины. Существенных расовых различий в структуре заболеваемости не обнаружено. На клеточном уровне болезнь характеризуется массовой гибелью дофаминергических нейронов в черной субстанции и наличием в них телец Леви, что приводит к нарушению координации движений (De Lau, Breteler, 2006).

Этиология болезни Паркинсона окончательно не выяснена, однако факторами риска являются генетическая предрасположенность и воздействие факторов окружающей среды. Х.Н. Нгуен и соавторы получили ИПСК от пациентов с болезнью

Паркинсона с мутацией G2019S в гене LRRK2. Дифференцированные из ИПСК нейроны продемонстрировали повышенную экспрессию ключевых генов ответа на окислительный стресс и белка альфа синуклеина. Тест на активацию каспазы-3 продемонстрировал более высокую чувствительность мутантных нейронов к воздействию таких химических агентов, как перекись водорода, протеасомный ингибитор MG132 и 6-гидроксидофамин по сравнению с нормальными нейронами (Nguyen et al., 2011). Х. Лю и коллеги с помощью нейронов, полученных из ИПСК с мутацией G2019S в гене LRRK2, обнаружили аномалии архитектуры клеточного ядра в мутантных нейронах. Далее они провели анализ посмертных срезов мозга пациентов с диагнозом «болезнь Паркинсона» и тоже обнаружили наличие аномалий клеточных ядер (Liu et al., 2012). С.У. Чунг и соавторы с помощью нейронов, полученных из ИПСК от пациентов с болезнью Паркинсона, подтвердили восстановление патологического фенотипа до нормы с помощью химической молекулы, которая была первоначально найдена в скрининге на дрожжах как потенциальное лекарство против болезни Паркинсона (Chung et al., 2013).

6. Болезнь Гентингтона

Болезнь (хорея) Гентингтона – одно из наиболее известных экстрапирамидных наследственных нейродегенеративных заболеваний. Распространенность хореи Гентингтона колеблется от 0,1–0,38 (Япония, страны Африки) до 3–7 (страны Западной и Восточной Европы, США, Канада) на 100 000 населения, в некоторых популяциях доходя до 15–17 и выше на 100 000 человек (остров Тасмания, Венесуэла). Клинические проявления заболевания развиваются обычно на 4–5-ом десятилетиях жизни (средний возраст начала 35–44 года), причем вследствие практически полной пенетрантности мутантного гена хореи Гентингтона его носитель неизбежно заболевает. Дети больного относятся к группе риска с вероятностью передачи им мутантного гена 50%. Болезнь Гентингтона неуклонно прогрессирует и неизбежно заканчивается полным распадом личности и обездвиженностью больных, требующих постоянного ухода (Harper, 2005). Клонирование гена HTT (гентингтина), мутация в котором приводит к развитию хореи Гентингтона, в 1993 г. (The Huntington's..., 1993) явилось первым важнейшим шагом в изучении молекулярных механизмов болезни Гентингтона, при данном заболевании имеет место аномальное увеличение числа («экспансия») тринуклеотидных цитозин-аденин-гуаниновых (CAG) повторов в первом экзоне гена HTT. Ген HTT состоит из 67 экзонов и имеет длину более 200 т.п.н. Нормальные аллели гена HTT содержат 10–35 повторов (медиана – 18). Аллели с числом CAG-повторов 27–35 называют промежуточными, или «мутабельными» (Potter et al., 2004). У больных типичными клинически манифестными формами хореи Гентингтона число CAG-триплетов составляет 40 и более, в редких случаях может превышать 100. Различными группами исследователей были выявлены разнообразные значимые клинико-генетические корреляции при хорее Гентингтона. Показано, что с увеличением числа копий CAG-повторов снижается возраст начала хореи Гентингтона (Langbehn et al., 2004), возраст дебю-

та отдельных клинических симптомов и возраст смерти (Aziz et al., 2009), а также ускоряется темп прогрессирования заболевания (Illarioshkin et al., 1994). Гентингтин широко экспрессируется в различных органах и тканях. При хорее Гентингтона методом электронной микроскопии в нейронах стриатума выявляются характерные внутриядерные включения, представляющие собой высокомолекулярные амилоидоподобные агрегаты. Присутствие в составе включений мутантного белка HTT подтверждается с помощью иммуногистохимического исследования (DiFiglia et al., 1997). Функция HTT до сих пор точно не известна, ее изучение представляется, таким образом, одной из актуальных проблем современной нейробиологии. С. Камнасио и соавторы впервые получили целый набор ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона, состоящий из трех линий от разных пациентов. Сравнительный анализ мутантных и нормальных нейронов, полученных из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона, позволил выявить повышенную активность лизосом в мутантных нейронах по сравнению с нормой (Camnasio et al., 2012). Консорциум по изучению болезни Гентингтона с помощью ИПСК сообщил о получении 14 линий ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона и от здоровых пациентов. Дифференцированные из ИПСК нейроны продемонстрировали ассоциированные с заболеванием патологические изменения в электрофизиологиии, метаболизме и клеточной адгезии. Мутантные нейроны со средним и большим количеством повторов также продемонстрировали повышенный уровень клеточной гибели по сравнению с нормой (The HD iPSC..., 2012). И. Чон и соавторы идентифицировали агрегаты гентингтина в нейронах, полученных из ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона, после длительного культивирования или интеграции в мозг крыс (Jeon et al., 2012).

7. Болезнь Альцгеймера

Болезнь Альцгеймера – это наиболее распространенное нейродегенеративное заболевание, которое приводит к прогрессирующему снижению памяти человека, способности общаться и выполнять ежедневные действия. Как правило, болезнь Альцгеймера обнаруживается у людей старше 65 лет (Brookmeyer et al., 1998), но существует и ранняя форма заболевания. Патология головного мозга при болезни Альцгеймера характеризуется массовой гибелью нейронов, в частности холинергических; образуются внутриклеточные нейрофибриллярные агрегаты, состоящие из тау-белка, и внеклеточные агрегаты, состоящие из β-амилоида – продукта расщепления белка-предшественника амилоида (APP). Эти два вида нерастворимых белковых агрегатов сопровождаются хронической воспалительной реакцией и значительным окислительным стрессом (Ooi et al., 2013). Различными группами исследователей разработаны системы для поиска новых лекарств методом скрининга на нейронах, полученных из ИПСК (Yagi et al., 2011; Yahata et al., 2011). М.А. Израэль и соавторы получили ИПСК от двух пациентов с наследственной формой болезни Альцгеймера, от двух пациентов со спорадической формой болезни Альцгеймера и от двух здоровых пациентов (Israel et al., 2012). Из этих ИПСК были получены

высокоочищенные культуры нейронов. По сравнению с нормой, нейроны от пациентов с болезнью Альцгеймера демонстрировали значительно более высокие уровни β-амилоида (1–40), фосфо-тау (Thr 231) и активную гликогенсинтазу-киназу-3β (aGSK-3β). Также было обнаружено накопление огромных, Rab5-положительных, ранних эндосом. Обработка нейронов с помощью ингибиторов β-секретазы, но не γ-секретазы приводила к значительному снижению уровней фосфо-тау (Thr231) и aGSK-3β. Т. Кондо и коллеги получили ИПСК от пациентов с наследственной и спорадической формами болезни Альцгеймера, после чего ИПСК дифференцировали в нейроны. Были обнаружены олигомеры Aβ, которые накапливались в нейронах с мутацией (APP)-E693Δ , и в нейолнах, полученных из ИПСК пациента со спорадической формой болезни Альцгеймера, что приводило к стрессу эндоплазматического ретикулума и окислительному стрессу. Обнаруженные Aβ олигомеры не были устойчивы к протеолизу, и обработка докозагексаеновой кислотой приводила к снижению реакции на стресс. Авторы работы предположили, что докозагексаеновая кислота может быть эффективным лекарством для некоторых подгрупп пациентов с болезнью Альцгеймера, что также подтверждается данными клинических исследований (Kondo et al., 2013). А.А. Спроул и соавторы получили ИПСК от здоровых пациентов и пациентов с наследственной ранней болезнью Альцгеймера, причина которой – мутация в гене PSEN1. ИПСК были дифференцированы в нейрональные предшественники. Мутантные дифференцированные нейроны продемонстрировали патологический процессинг APP, характерный для болезни Альцгеймера. Сравнительный анализ экспрессии генов позволил идентифицировать 14 дифференциально экспрессированных генов (Sproul et al., 2014).

8. Шизофрения

Шизофрения — это полиморфное психическое расстройство или группа психических расстройств, характеризующихся нарушением процессов мышления и эмоциональных реакций. Болезнь обычно начинается в позднем подростковом или раннем юношеском возрасте. Шизофренические расстройства в целом отличаются характерными фундаментальными расстройствами мышления и восприятия, а также неадекватным или сниженным аффектом. Частота встречаемости составляет 4–6 случаев на 1000 человек населения (Bhugra, 2005). Шизофрения является наследственным полигенным заболеванием, наследуемость достигает 80% (Sullivan et al., 2003). Несмотря на неоднородность в клинических признаках, исследователи выявили общие нарушения, характерные для шизофрении, с помощью посмертных исследований головного мозга пациентов, фармакологических и генетических исследований на животных моделях. Общие проявления болезни включают в себя сниженное количество синапсов, сниженный объем тел нейронов, увеличенные желудочки головного мозга, а также изменения в синапсах с участием дофамина, глутамата, и γ-аминомасляной кислоты (GABA) (Harrison, 1999; Jaaro-Peled et al., 2010). К.Дж. Бреннанд и соавторы репрограммировали фибробласты, полученные от пациентов с шизофренией. Полученные ИПСК были дифференцированы

в нейроны. Мутантные нейроны имели по сравнению с нейронами дикого типа меньшее число связей и меньшее количество нейритов, сниженный уровень экспрессии белка PSD95 и рецепторов глутамата. Обработка нейронов нейролептиком локсапином, который обычно используют для терапии шизофрении, приводила к смягчению наблюдаемых фенотипических проявлений (Brennand et al., 2011). О. Робиксек и коллеги получили ИПСК из кератиноцитов волосяного фолликула от трех пациентов с диагнозом шизофрения и от двух здоровых пациентов. Далее ИПСК дифференцировали в дофаминэргические и глутаматэргические нейроны. Эксперименты по дифференцировке в дофаминэргические нейроны показали сниженную способность к дифференцировке, в то время как дифференцировка в глутаматэргические нейроны выявила неспособность мутантных нейронов созревать. Исследователи также наблюдали в мутантных нейронах нарушения структуры и функций митохондрий (Robicsek et al., 2013).

9. Заключение

Технологии репрограммирования соматических клеток до плюрипотентного состояния совместно с технологиями культивирования и дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток человека открыли целый ряд новых возможностей в поиске новых лекарств и клеточной терапии. Для задач моделирования заболеваний ИПСК предоставляют уникальную возможность неограниченного производства стандартизованных культур соматических клеток человека. Это особенно ценно для моделирования заболеваний нервной системы ввиду ограниченного доступа исследователей к нейронам человека. Модели болезней на основе ИПСК человека уже успешно применяют для изучения молекулярных основ патогенеза и разработки новых лекарственных средств, в том числе с использованием высокопроизводительного скрининга. Возможность получения ИПСК от конкретного пациента позволяет решить проблему отторжения трансплантата при клеточной терапии, также ИПСК позволяют избежать этических проблем, связанных с ЭСК. Однако для применения ИПСК в клеточной терапии потребуется еще большой объем научных исследований и длительные клинические испытания.

Литература

Aasen T., Raya A., Barrero M.J., et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes // Nat. Biotechnol. 2008. Vol. *26*. P. 1276-1284.

Amoroso M.W., Croft G.F., Williams D.J., et al. Accelerated high-yield generation of limb-innervating motor neurons from human stem cells // J. Neurosci. 2013. Vol. 33. P. 574-586.

Aoi T., *Yae K., Nakagawa M., et al.* Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells // Science. 2008. Vol. 321. P. 699-702.

Aziz N.A., *Jurgens C.K., Landwehrmeyer G.B. et al.* Normal and mutant HTT interact to affect clinical severity and progression in Huntington disease // Neurology. 2009. Vol. 73. P. 1280-1285.

Bhugra D. The global prevalence of schizophrenia // PLoS Med. 2005. Vol. 2. P. e151-e175.

Brennand K.J., *Simone A., Jou J. et al.* Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells // Nature. 2011. Vol. 473. P. 221-225.

Briggs R., *King T.J.* Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1952. Vol. 38. P. 455-463.
Brookmeyer R., *Gray S., Kawas C.* Projections of Alzheimer's disease in the United States and the public health impact of delaying disease onset // Am. J. Public Health. 1998. Vol. 88. P. 1337-1342.
Camnasio S., *Delli Carri A., Lombardo A. et al.* The first reported generation of several induced pluripotent stem cell lines from homozygous and heterozygous Huntington's disease patients demonstrates mutation related enhanced lysosomal activity // Neurobiol. Dis. 2012. Vol. 46. P. 41-51.
Campbell K.H., *McWhir J., Ritchie W.A. et al.* Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line // Nature. 1996. Vol. 380. P. 64-66.
Chung C.Y., *Khurana V., Auluck P.K. et al.* Identification and rescue of α-synuclein toxicity in Parkinson patient-derived neurons // Science. 2013. Vol. 342. P. 983-987.
Colman A. Profile of John Gurdon and Shinya Yamanaka, 2012 Nobel laureates in medicine or physiology // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. Vol. 110. P. 5740-5741.
Davis R.L., *Weintraub H., Lassar A.B.* Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts // Cell. 1987. Vol. 51. P. 987-1000.
De Lau L.M.L., *Breteler M.M.B.* Epidemiology of Parkinson's disease // Lancet Neurol. 2006. Vol. 5. P. 525-535.
DiFiglia M., *Sapp E., Chase K.O. et al.* Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain // Science. 1997. Vol. 277. P. 1990-1993.
Eggan K., *Akutsu H., Loring J. et al.* Hybrid vigor, fetal overgrowth, and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. Vol. 98. P. 6209-6214.
Eminli S., Utikal J., Arnold K. et al. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression // Stem. Cells. 2008. Vol. 26. P. 2467-2474.
Espuny-CamachoI., *Michelsen K.A., Gall D. et al.* Pyramidal neurons derived from human pluripotent stem cells integrate efficiently into mouse brain circuits *in vivo* // Neuron. 2013. Vol. 77. P. 440-456.
Evans M.J., *Kaufman M.H.* Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // Nature. 1981. Vol. 292, P. 154-156.
Fusaki N., Ban H., Nishiyama A. et al. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome // Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci. 2009. Vol. 85. P. 348-362.
Gurdon J.B. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles // J. Embryol. Exp. Morphol. 1962. Vol. 10. P. 622-640.
Hanna J., *Markoulaki S., Schorderet P. et al.* Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency // Cell. 2008. Vol. 133. P. 250-264.
Hanna J.H., Saha K., Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues // Cell. 2010. Vol. 143. P. 508-525.
Harper B. Huntington disease // J. R. Soc. Med. 2005. Vol. 98. P. 550.
Harrison P.J. The neuropathology of schizophrenia. A critical review of the data and their interpretation // Brain. 1999. Vol. 122. Pt. 4. P. 593-624.
Hou P., *Li Y., Zhang X. et al.* Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds // Science. 2013. Vol. 341. P. 651-654.
Huangfu D., Osafune K., Maehr R. et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2 // Nat. Biotechnol. 2008. Vol. 26. P. 1269-1275.
Illarioshkin S.N., Igarashi S., Onodera O. et al. Trinucleotide repeat length and rate of progression of Huntington's disease // Ann. Neurol. 1994. Vol. 36. P. 630-635.
Israel M.A., *Yuan S.H., Bardy C. et al.* Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells // Nature. 2012. Vol. 482. P. 216-220.
Jaaro-Peled H., *Ayhan Y., Pletnikov M.V. et al.* Review of pathological hallmarks of schizophrenia: comparison of genetic models with patients and nongenetic models // Schizophr. Bull. 2010. Vol. 36. P. 301-313.
Jeon I., *Lee N., Li J.Y. et al.* Neuronal properties, in vivo effects, and pathology of a Huntington's disease patient-derived induced pluripotent stem cells // Stem. Cells. 2012. Vol. 30. P. 2054-2062.
Kim D., *Kim C.H., Moon J.I. et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins // Cell. Stem. Cell. 2009. Vol. 4. P. 472-476.

Kondo T., *Asai M., Tsukita K. et al.* Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular Aβ and differential drug responsiveness // Cell. Stem. Cell. 2013. Vol. 12. P. 487-496.

Kriks S., *Shim J.W., Piao J. et al.* Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease // Nature. 2011. Vol. 480. P. 547-551.

Kwon D.J., *Jeon H., Oh K.B. et al.* Generation of leukemia inhibitory factor-dependent induced pluripotent stem cells from the Massachusetts General Hospital miniature pig // Biomed. Res. Int. 2013. Vol. 2013. P. 140639.

Lagarkova M.A., *Shutova M.V., Bogomazova A.N. et al.* Induction of pluripotency in human endothelial cells resets epigenetic profile on genome scale // Cell. Cycle. 2010. Vol. 9. P. 937-946.

Langbehn D.R., *Brinkman R.R., Falush D. et al.* A new model for prediction of the age of onset and penetrance for Huntington's disease based on CAG length // Clin. Genet. 2004. Vol. 65. P. 267-277.

Li W., *Wei W., Zhu S. et al.* Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors // Cell. Stem. Cell. 2009a. Vol. 4. P. 16-19.

Li W., *Zhou H., Abujarour R. et al.* Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 // Stem. Cells. 2009b. Vol. 27. P. 2992-3000.

Liu G.H., *Qu J., Suzuki K. et al.* Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2 // Nature. 2012. Vol. 491. P. 603-607.

Liu H., *Zhu F., Yong J. et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts // Cell. Stem. Cell. 2008. Vol. 3. P. 587-590.

Ma L., *Hu B., Liu Y. et al.* Human embryonic stem cell-derived GABA neurons correct locomotion deficits in quinolinic acid-lesioned mice // Cell. Stem. Cell. 2012. Vol. 10. P. 455-464.

Martin G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1981. Vol. 78. P. 7634-7638.

Misra R.P., *Bronson S.K., Xiao Q. et al.* Generation of single-copy transgenic mouse embryos directly from ES cells by tetraploid embryo complementation // BMC Biotechnol. 2001. Vol. 1. P. 12.

Nguyen H.N., *Byers B., Cord B. et al.* LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress // Cell. Stem. Cell. 2011. Vol. 8. P. 267-280.

Okita K., *Nakagawa M., Hyenjong H. et al.* Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors // Science. 2008. Vol. 322. P. 949-953.

Ooi L., *Sidhu K., Poljak A. et al.* Induced pluripotent stem cells as tools for disease modelling and drug discovery in Alzheimer's disease // J. Neural. Transm. 2013. Vol. 120. P. 103-111.

Park I.H., *Arora N., Huo H. et al.* Disease-specific induced pluripotent stem cells // Cell. 2008. Vol. 134. P. 877-886.

Potter N.T., S*pector E.B., Prior T.W.* Technical standards and guidelines for Huntington disease testing // Genet. Med. 2004. Vol. 6. P. 61-65.

Rais J., Zviran A., Geula S. et al. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency // Nature. 2013. Vol. 502. P. 65-70.

Robicsek O., *Karry R., Petit I. et al.* Abnormal neuronal differentiation and mitochondrial dysfunction in hair follicle-derived induced pluripotent stem cells of schizophrenia patients // Mol. Psychiatry. 2013. Vol. 18. P. 1067-1076.

Shi Y., *Do J.T., Desponts C. et al.* A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells // Cell. Stem. Cell. 2008. Vol. 2. P. 525-528.

Sproul A.A., *Jacob S., Pre D. et al.* Characterization and Molecular Profiling of PSEN1 Familial Alzheimer's Disease iPSC-Derived Neural Progenitors // PLoS One. 2014. Vol. 9. P. e84547.

Stadtfeld M., *Hochedlinger K.* Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications // Genes. Dev. 2010. Vol. 24. P. 2239-2263.

Stadtfeld M., *Maherali N., Breault D.T. et al.* Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse // Cell. Stem. Cell. 2008. Vol. 2. P. 230-240.

Sullivan P.F., *Kendler K.S., Neale M.C.* Schizophrenia as a complex trait: evidence from a meta-analysis of twin studies // Arch. Gen. Psychiatry 2003. Vol. 60. P. 1187-1192.

Takahashi K., *Yamanaka S.* Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // Cell. 2006. Vol. 126. P. 663-676.

Takahashi K., *Tanabe K., Ohnuki M. et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors // Cell. 2007. Vol. 131. P. 861-872.

The HD iPSC Consortium. Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes // Cell. Stem. Cell. 2012. Vol. 11. P. 264-278.

The Huntington's Disease Collaborative Research Group. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes // Cell. 1993. Vol. 72. P. 971-983.

Thomson J.A., *Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // Science. 1998. Vol. 282. P. 1145-1147.

Warren L., *Manos P.D., Ahfeldt T. et al.* Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA // Cell. Stem. Cell. 2010. Vol. 7. P. 618-630.

Wilmut I., *Schnieke A.E., McWhir J. et al.* Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells // Nature. 1997. Vol. 385. P. 810-813.

Woltjen K., *Michael I.P., Mohseni P. et al.* piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells // Nature. 2009. Vol. 458. P. 766-770.

Yagi T., *Ito D., Okada Y. et al.* Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells // Hum. Mol. Genet. 2011. Vol. 20. P. 4530-4539.

Yahata N., *Asai M., Kitaoka S. et al.* Anti-Aβ drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease // PLoS One. 2011. Vol. 6. P. e25788.

Yu J., *Vodyanik M.A., Smuga-Otto K. et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells // Science. 2007. Vol. 318. P. 1917-1920.

Yu J., *Hu K., Smuga-Otto K. et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences // Science. 2009. Vol. 324. P. 797-801.

Zhao X., *Li W., Lv Z. et al.* iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation // Nature. 2009. Vol. 461. P. 86-90.

Zhou W., *Freed C.R.* Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells // Stem. Cells. 2009. Vol. 27. P. 2667-2674.

Разработка пористых полимерных матриксов-носителей для нейротрансплантатов

В.Н. Баграташвили, Е.Н. Антонов, А.В. Королева, В.К. Попов, П.С. Тимашев, А.В. Миронов, Б.Н. Чичков, М.В. Ведунова, Т.В. Шишкина, Е.В. Митрошина, Т.А. Сахарнова, И.В. Мухина

Содержание

1. Введение
2. Разработка пористых матриц-носителей с использованием сверхкритических флюидных технологий
3. Разработка пористых матриц-носителей с использованием метода поверхностного селективного лазерного спекания
4. Разработка пористых матриц-носителей с использованием метода двухфотонной фотополимеризации
5. Исследование токсичности и биосовместимости полимерных пористых матриксов при культивировании шванновских клеток
6. Исследование *in vitro* биосовместимости матриксов на основе гибридной золь-гель-полимерной системы, содержащей Zr, полученных методом двухфотонной фотополимеризации
7. Заключение

1. Введение

Интракраниальная трансплантация различных видов аутологичных стволовых клеток (СК): мезенхимальных (МСК), нейральных (НСК), индуцированных плюрипотентных (iPS), обкладочных нейроэпителиальных клеток (ОНК) из обонятельной выстилки является одним из современных и активно разрабатываемых в эксперименте способов коррекции различных терапевтически резистентных нарушений центральной нервной системы (ЦНС), таких как нейродегенеративные и ишемические заболевания, травмы, послеоперационные повреждения (Honmou et al., 2011; Li et al., 2013; Cui et al., 2013; Jiang et al., 2013; Ishiai 2013; Bhasin et al., 2013; Chen et al., 2014; Balseanu et al., 2014; Chan et al., 2014; Hao et al., 2014; Kalladka, Muir, 2014; Im, Kim, 2014; Morgan, Srivastava; 2014; Tajiri et al., 2014; Álvarez et al., 2014).

Сокращения: 2ФП – двухфотонная полимеризация; МК – метакриловая кислота; МОПТМС – метакрилоксипропил триметоксисилан; МСК – мезенхимальные стволовые клетки; НСК – нейральные стволовые клетки; ПСЛС – поверхностно-селективное лазерное спекание; ПЕГ-ДА – полиэтиленгликоль-диакрилат; ПЭДТ – поли(3,4)-этилендиокситиофен; СК – стволовые клетки; СКФ – сверхкритические флюидные технологии; ск-СО2 – сверхкритический диоксид углерода; ЦНС – центральная нервная система; ЦПО – N-пропоксид Zr; ЭДТ – 3,4-этилендиокситиофен, iPS-индуцированные плюрипотентные; PCL – поликапролактон; PLA – полимолочная кислота; PLGA – сополимер полимолочной и полигликоливой кислоты.

В качестве носителя СК в экспериментальных моделях нейротрансплантации обычно используют непосредственно суспензии клеток. В то же время, показано, что максимально эффективным является применение бионосителей клеток или нейротрансплантантов, обеспечивающих быструю консолидацию разобщенных участков нервной ткани и создающих оптимальную среду для облегчения роста аксонов. Одним из таких бионосителей может рассматриваться гемостатическая губка, которая со временем рассасывается, выполнив свою функцию наполнителя. Однако и в этом случае остается много нерешенных проблем, связанных с целевым интегрированием стволовых клеток в нужные участки мозга и требующих программированного их выделения из носителя (скаффолда – *scaffold*), сохранения в локальном месте повреждения необходимой ниши для дифференцирования прогениторных клеток в нужные специализированные нейроны и клетки глии. Так, при применении гемостатических губок нейротрансплантат слишком быстро подвергается рассасыванию, а находившиеся в нем СК вымываются током крови и только в небольшом проценте случаев интегрируются в паренхиму мозга (Bible et al., 2009; Stabenfeldt et al., 2010; Cheng et al., 2012; Zustiak et al., 2013).

Кроме того, материал, используемый для скаффолда, должен обладать не только большой инертностью к тканям мозга, программируемой скоростью рассасывания, но и свойством предупреждения формирования глиальных и соединительнотканных рубцов, нарушающих связи в формирующихся заново нейронных сетях мозга. В идеале такой нейроматрикс должен быть снабжен определенным набором «векторов» или факторов дифференцировки и нейротрофического действия, обеспечивающих направленное деление и развитие стволовых (или малодифференцированных) клеток. Он должен также оказывать модулирующее влияние на эндогенные нейральные стволовые клетки, которые, как известно, обладают очень ограниченным репаративным потенциалом (Li et al., 2008). Их пролиферативного ресурса хватает, как правило, для компенсации нейрональных потерь, возникающих при небольших повреждениях ЦНС, преходящих нарушениях мозгового кровообращения (транзиторные ишемические атаки, гипертонические кризы), сотрясениях и ушибах головного и спинного мозга легкой и средней степени тяжести. Однако при обширных повреждениях ЦНС их пролиферативные возможности оказываются недостаточными для компенсации неврологического дефицита и образования новых, функционально активных синаптически связанных нейронных сетей.

Известно, что главным препятствием для активной клеточной пролиферации, дифференцировки и направленного роста новообразованных волокон является группа факторов-репеллентов (сульфатированные гликозоаминопротеогликаны), источником которых становятся фрагменты размозженной нервной ткани и компоненты межклеточного матрикса (Schwend et al., 2012; Yi et al., 2012; Dudas, Semeniken, 2012). Поэтому одним из путей совершенствования биополимерных нейрокомпозитов считается использование компонентов, не только ингибирующих апоптоз и избыточную астроцитарно-микроглиальную реакцию, но и факторов, нейтрализующих эффекты репеллентов. Возможный механизм реализации такого действия связан с созданием особого типа матриксов с детерминированным сроком динамического высвобождения заключенных в них нейроактивных веществ.

Гипотетически подобная структура способна выполнять в поврежденной нервной ткани тройственную роль – тканевого нейропротеза, вектора дифференцировки и нейропротективного агента.

В настоящее время как за рубежом, так и в России активно развиваются направления регенеративной медицины, связанные с разработкой различных биосовместимых материалов матриксов-носителей (скаффолдов), в том числе и нейроматриксов, используемых при тканевой и органной инженерии спинного и головного мозга. Разработкой и изучением свойств пригодных для трансплантации биополимерных матриксов занимаются ведущие лаборатории мира. Предложены нейроматриксы «NeuroGel» (IMITE, Швейцария); «RMx» (Total ReCord, США) и др. (Gatskiy et al., 2014; Woerly et al., 2004; Madigan et al., 2014; Kim et al., 2014; Cigonini et al., 2014). Полностью Российской разработкой является биополимерный деградируемый нейроматрикс «СфероГель-Э». В ходе его предварительных экспериментальных и клинических испытаний при травме спинного мозга было показано, что матрикс способствует более быстрому формированию нейропротезирующей ткани между пересеченными концами спинного мозга и препятствует образованию глиомезодермального рубца, ограничивающего регенерацию аксонов спинномозговых трактов (Брюховецкий и др., 2008; Астасидис и др., 2009; Федяков и др., 2009; Astacidis et al., 2011). Однако недостаточно изученными остаются механизмы, лежащие в основе его консолидирующей роли, а также возможность использования гелеобразного матрикса в качестве трансплантационной среды для прогениторных клеток мозга, способной обеспечивать их выживание и направленную дифференцировку, формирование функциональных нейронных сетей.

Создание эффективного, инертного, с программируемой биодеградацией и выделением биологически активных веществ для создания ниши носителя для нейротрансплантации будет прорывным инновационным методом для разработки новых немедикаментозных методов лечения многих заболеваний мозга, обусловленных повреждением нейронных сетей, глиальных элементов и матрикса мозга.

Нами были разработаны экспериментальные макеты материалов для нейротрансплантантов на основе полимеров с целью последующего изучения молекулярных механизмов взаимодействия материала скаффолда с популяциями аутологичных стволовых клеток, возможности создания тканеинженерной конструкции для заместительной терапии различных повреждений мозга, исследования в эксперименте отдаленных результатов воздействия нейротрансплантанта на ткань мозга.

В представленной работе были поставлены следующие задачи:

1. Разработать методику создания матриксов для нейротрансплантации с использованием метода поверхностно-селективного лазерного спекания (ПСЛС), двухфотонной полимеризации (2ФП) и сверхкритических флюидных технологий (СКФ), обладающих определенной геометрией, скоростью рассасывания матрикса, соответствующей скорости роста аксонов и дендритов, и формирования нейронных сетей в поврежденном участке мозга, программируемого для выделения биологически активных веществ (антиоксидантов, факторов роста, нейротрофических факторов) с целью поддержания определенной ниши в имплантируемом участке мозга;

2. Изучить токсические свойства матриксов при культивировании на них клеток мозга и выявить биосовместимость материала матрикса *in vitro* с использованием широкопольной и лазерной флуоресцентной конфокальной микроскопии.

2. Разработка пористых матриц-носителей с использованием сверхкритических флюидных технологий

К матрицам, предназначенным для трансплантации, предъявляются жесткие и разнообразные требования. В первую очередь они должны быть биологически совместимыми. Материал матрицы не должен провоцировать недопустимого клеточного ответа и быть иммуногенным и токсичным. Механические свойства матриц должны соответствовать характеристикам восстанавливаемой ткани. Матрица должна обеспечивать механическую прочность и устойчивость структуры в процессе имплантации и затем – при ремоделировании ткани. Кроме того, матрицы должны быть пористыми, с контролируемой взаимосвязанностью пор, а архитектура материала не должна препятствовать начальному клеточному прикреплению и оставлять достаточное пространство для его ремоделирования и для поддержания жизнедеятельности растущей ткани (Hutmacher et al., 2004).

Важным условием при выборе материала матриц является совмещение скорости биорезорбции со скоростью регенерации ткани на месте имплантата. Процесс деградации должен проходить с такой скоростью, чтобы имплантируемая конструкция сохраняла свою механическую прочность на протяжении по крайней мере того периода времени, который требуется для формирования определенной части новой ткани. Наиболее перспективными и востребованными материалами для формирования матриц являются алифатические полиэфиры: полимолочная кислота (PLA), полигликолевая кислота (PGA) и их сополимеры (PLGA), а также поликапролактон (PCL).

PGA – твердый термопластичный материал с высокой кристалличностью. Температура стеклования и температура плавления PGA составляют 36°C и 225°C, соответственно. Привлекательность PGA как биодеградирующего полимера для медицинского применения в том, что продукт его деградации, гликолевая кислота, является естественным метаболитом. Организм содержит хорошо регулируемые механизмы для полного удаления мономерных компонент гликолевой кислоты. В конечном итоге она разлагается на углекислый газ и воду, которые удаляются через дыхательную систему (Gunatillake, Adhikari, 2003).

PLA представлен в трех формах: D-изомеры, L-изомеры и смесь D-, L-форм. L- и D-формы полукристаллические, твердые. DL-форма – аморфная. Скорости деградации PLA и PGA примерно одинаковы. PLA – более гидрофобен, чем PGA, и более устойчив к гидролитическим воздействиям. В основном используют L-изомер, так как он лучше усваивается организмом. PLA при разложении образует молочную кислоту, которая присутствует в организме в нормальных условиях. Она, в свою очередь, разлагается в цикле трикарбоновых кислот на воду и углекислый газ. Сополимеры полимолочной и полигликолевой кислот менее устойчивы к гид-

ролизу, чем каждый из полимеров в отдельности, они были одобрены Агентством по контролю за лекарствами и продуктами питания США как первые безопасные биоматериалы для тканевой инженерии и используются для восстановления дефектов костной и хрящевой ткани в клинической практике (Yang et al., 2001). На сегодняшний день семейство алифатических полиэфиров обладает наилучшей биологической совместимостью среди биорезорбируемых полимеров, и они были выбраны нами в качестве материалов для формирования матриц.

На скорость деградации полимеров влияет много различных факторов: морфология полимера, молекулярная масса, архитектура, физиологические условия и т.д. Данные по скоростям деградации, которые приводятся фирмами производителями, являются приблизительными, поскольку обычно не указываются размеры и формы исследуемых образцов и параметров испытаний. По этим данным можно только оценивать относительные скорости резорбции. Известно, что скорость биодеградации возрастает с уменьшением молекулярной массы полимера. Скорость биодеградации PCL значительно ниже, чем для PLA, PGA и их сополимеров. PCL применяется для процессов восстановления, требующих большой длительности, а также в качестве систем доставки лекарств с пролонгированным высвобождением (Sun, Downes, 2009).

Традиционные способы формирования матриц обладают рядом принципиальных недостатков, обусловленных как применением токсичных органических растворителей, так и использованием высокой (100°C и выше) температуры в процессе их производства. В первом случае, воздействие растворителя может приводить к изменению биохимических свойств полимеров. Помимо этого, наличие токсичных следов растворителей в конечном продукте может инициировать как местную, так и системную иммунную реакцию организма (LeMaitre et al., 2004). Во втором случае высокая температура может приводить к неконтролируемому изменению свойств самой полимерной матрицы (Griffith, 2000). Кроме того, применение высокотемпературных технологий резко сужает круг практически ценных, но термолабильных биоактивных соединений, которые могли бы быть введены в полимерные матрицы и использованы для решения широкого круга биомедицинских проблем.

Основным преимуществом метода формирования полимерных матриц с использованием СКФ-технологий является то, что с их помощью можно проводить обработку различных биополимеров при умеренных давлениях и физиологических температурах при отсутствии каких-либо токсичных компонентов. Например, у экологически чистой сверхкритической двуокиси углерода (ск-CO_2) критическая температура $T_{кр}$=31°C, а критическое давление $P_{кр}$=7,3 МПа.

После обработки в сверхкритической среде диоксид углерода легко и практически без остатка может быть удален из полимера простым сбросом давления ниже критического значения. Методологически сухая и низкотемпературная (около 40°C) технология формирования полимерных матриц в ск-CO_2 основана на явлениях снижения температуры стеклования T_g, пластификации, набухания и/или вспенивания аморфных и полукристаллических полимеров при их взаимодействии со сверхкритическим диоксидом углерода. В этих условиях частицы полимеров интегрируются между собой, и при сбросе давления CO_2 и выходе из сверхкрити-

ческого состояния образуется монолитная структура. В процессе формировании матриц в ск-CO_2 при определенных режимах сброса давления CO_2 до атмосферного значения может происходить формирование пористой структуры (Mooney et al., 1996). Таким образом, СКФ-технологии позволяют управлять пористостью полимерных структур путем изменения условий их обработки в ск-CO_2, а применение индивидуальных пресс-форм позволяет изготавливать матрицы заданной формы.

Формирование полимерных матричных структур обычно осуществляется в установке с камерой высокого давления, типичная схема которой представлена на рис. 1.

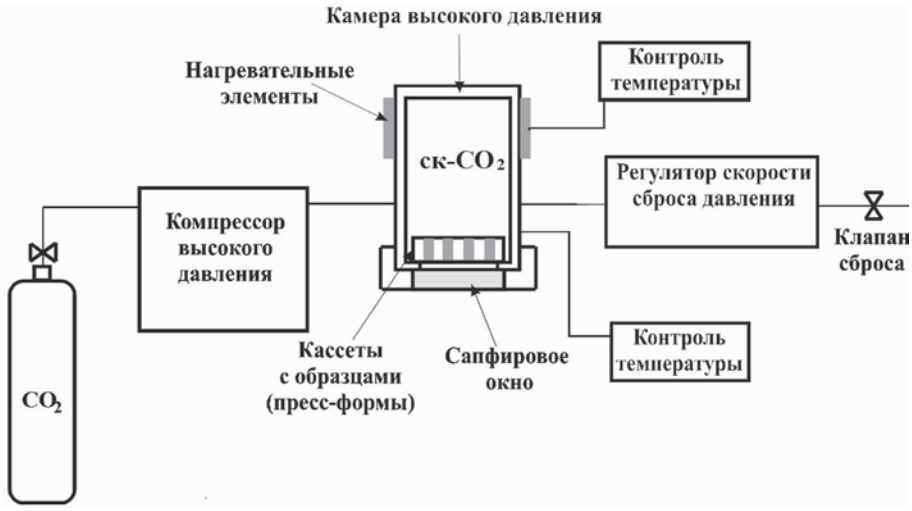


Рис. 1. Схема установки для формирования полимерных матричных структур в ск-CO_2

Для модификации в среде ск-CO_2 могут применяться стандартные исходные биодеградируемые полимеры PCL, PLA и др. Обычно полимеры предварительно размалываются в ротационной мельнице с использованием для охлаждения сухого льда. Размолотые порошки просеиваются через набор сит с целью отбора фракций с размерами частиц менее 200 мкм. После чего порошки полимеров засыпаются в ячейки пресс-форм, изготовленных из высокомолекулярного, нереакционноспособного полимера.

Полученные таким образом образцы представляют собой твердые пористые структуры, чья пористость определяется плотностью заполнения ячеек пресс-формы порошком исходного полимера и может составлять от 25 до 70%. Стоит отметить, что пористость матриц, получаемых с использованием ск-CO_2, формируется во время сброса давления в камере. Характер пор, их размер и распределение зависят от параметров процесса и свойств материала.

В качестве примера на рис. 2. представлены образцы матриц различной пористости, полученные при плотном заполнении ячеек пресс-форм и с уменьшенной навеской порошковой смеси. Микрофотографии структуры образцов матриц, полученных в ск-CO_2 из различных полимеров, представлены на рис. 3 и 4. В матрицах,

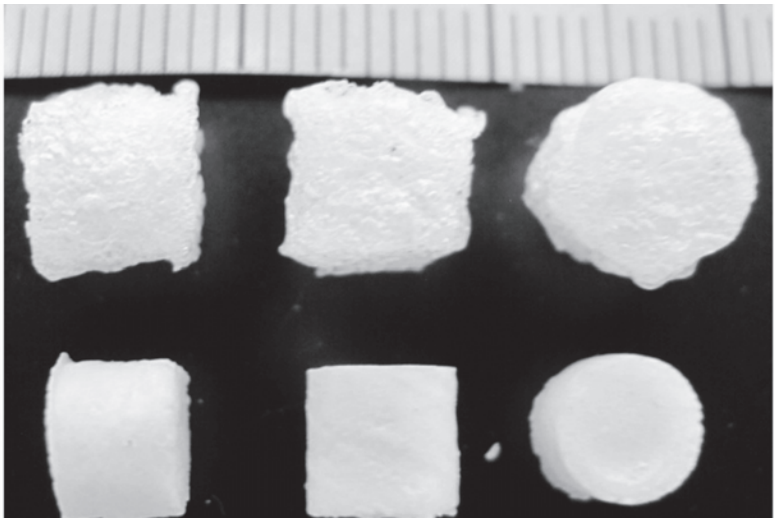


Рис. 2. Фотографии образцов матриц различной пористости, полученных в среде сверхкритического диоксида углерода

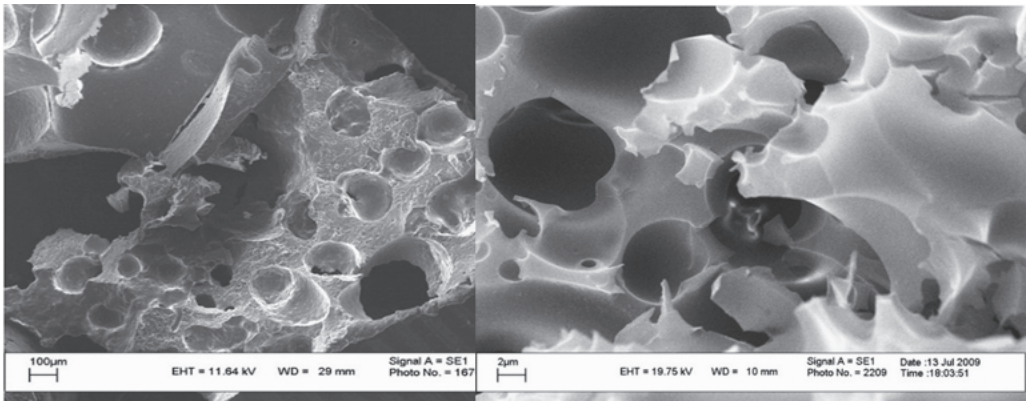


Рис. 3. Структура матрицы, сформированной из полилактида PDL 04

сформированных из полилактида и полилактогликолида (рис. 3) при одинаковых условиях, структура пор будет близкой. В то же время, как представлено на рис. 4, уменьшением скорости сброса давления можно получать поры более мелкого масштаба.

Таким образом, метод СКФ вспенивания представляет собой удобный и доступный способ создания матриксов для регенеративной медицины. Основным преимуществом описанного метода является возможность использования биодеградируемых полимеров без их химической модификации. Другим преимуществом метода СКФ является возможность единовременного получения серий образцов с

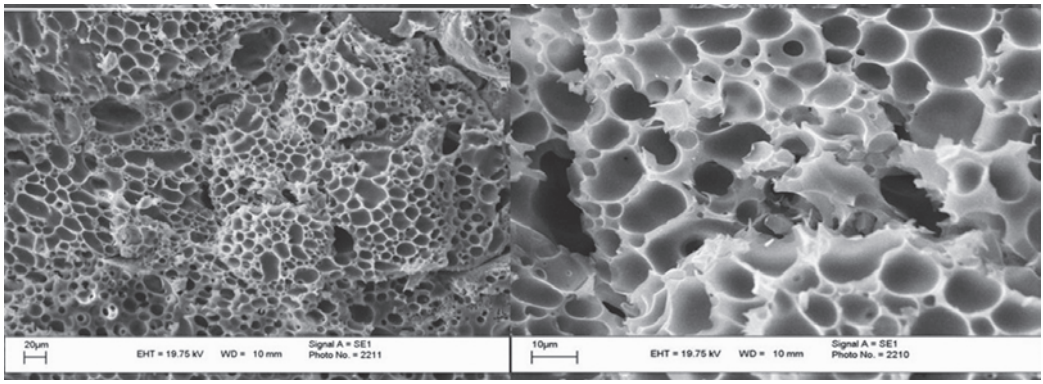


Рис. 4. Образцы полимерных матриц, изготовленных методом ПСЛС

разными линейными размерами, задаваемыми формой вставок, что значительно повышает время приготовления скаффолда. Помимо этого, низкие энергетические затраты делают способ СКФ-вспенивания одним из наиболее перспективных методов «зеленой химии». Также стоит отметить возможность введения в скаффолд различных биоактивных веществ на стадии его синтеза, например факторов роста или кальций-фосфатных соединений.

3. Разработка пористых матриц-носителей с использованием метода поверхностного селективного лазерного спекания

Методом монолитизации полимерных порошков в ск-CO_2 могут быть сформированы матрицы с параметрами, удовлетворяющими основным требованиям, предъявляемым при нейротрансплантации. Однако при изготовлении матриц сложной формы могут возникать технические проблемы, связанные с оперативным изготовлением соответствующих пресс-форм. Для изготовления изделий со сложной архитектурой в настоящее время широко используются методы быстрого прототипирования, послойного формирования трехмерных структур по компьютерным моделям (Попов и др., 2007). Использование этих методов для изготовления медицинских имплантатов с точно заданной формой, соответствующей форме устраняемого дефекта, позволяет сократить время и, соответственно, риски при проведении хирургических операций. Поэтому наряду с СКФ-технологиями для формирования матричных полимерных структур может быть применен метод ПСЛС (Antonov et al., 2006, Попов и др., 2006, Popov et al., 2007, Kanczler et al., 2009).

Селективное лазерное спекание имеет существенное ограничение по применению в биомедицине ввиду больших температурных градиентов внутри спекаемого слоя порошка, что может приводить к термодеструкции полимера и образованию токсичных компонентов. Для устранения указанных ограничений была разработана схема ПСЛС. В этой схеме используется лазерный источник, излучение которого не поглощается частицами полимера, а в порошок полимера добавляется сенси-

билизатор, наночастицы углерода, которые располагаются на поверхности частиц полимера. При такой схеме спекание может происходить при плавлении только поверхностных слоев частиц без изменения состояния их внутренних областей. Схема ПСЛС позволяет существенно уменьшить температурные градиенты внутри материала и позволяет снять имеющиеся ограничения на применение селективного лазерного спекания для формирования биосовместимых полимерных матриксов для тканевой инженерии.

Для формирования матриц методом ПСЛС могут использоваться те же полимеры, что и при изготовлении матричных структур с использованием сверхкритических флюидных технологий – PCL, PLA и др. Аналогично методу СКФ-вспенивания исходные полимеры размалывались в ротационной мельнице с использованием для охлаждения сухого льда. Обычно используется фракция полимера с размером частиц от 100 до 200 мкм. Для спекания частиц полимера методом ПСЛС полученные порошки смешиваются с сенсибилизатором, например с наночастицами углерода, количество которых варьируется от 0,1 до 0,5%.

Образцы матриц изготавливаются с использованием источника непрерывного излучения, например, может быть применен одномодовый волоконный лазер с длиной волны излучения 1,06 мкм и мощностью до 10 Вт (НТО «ИРЭ-Полюс», РФ). Сфокусированное лазерное излучение сканируется по поверхности слоя порошка. Типичные матрицы, полученные методом ПСЛС, представлены на рис. 5.

Ячеистая структура в сформированных ПСЛС матрицах является аналогом пористой структуры. Она задается при конструировании компьютерной модели, на основе которой изготавливаются полимерные структуры, и может составлять от 20 до 80%. Методом ПСЛС могут спекаться как плотные, так и пористые полимерные частицы. В процессе спекания материал частиц полностью или частично плавится, а исходный пористый материал становится более плотным. Соответственно, про-

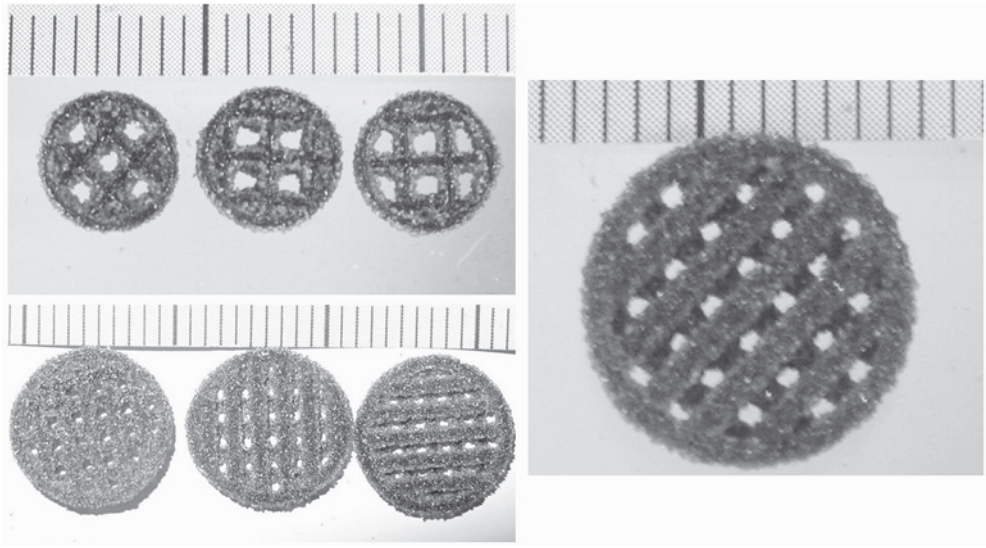


Рис. 5. Пример типичной структуры скаффолда, сформированного методом ПСЛС

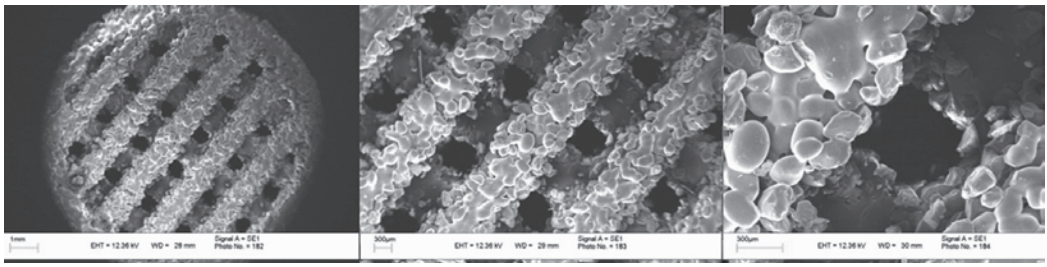


Рис. 6. Пример типичной микроструктуры структуры скаффолда, сформированного методом ПСЛС

исходит усадка материала. Управлять пористостью матрицы в этом случае можно путем формирования ячеистой структуры. Она задается при конструировании исходной компьютерной модели, а также в процессе изготовления путем изменения ширины и толщины спекаемого трека. В качестве примера приведены микрофотографии пористых матриц, сформированных методом поверхностного селективного лазерного спекания (рис. 6).

Очевидным преимуществом метода ПСЛС является быстрота формирования матрицы и возможность использования обычных биодеградируемых полимеров без их дальнейшей модификации. Помимо этого полученные материалы обладают значительными механическими характеристиками, а также развитой структурой пор. Одним из недостатков таких матриц является наличие в структуре сенсибилизатора, меняющего цвет скаффолда.

4. Разработка пористых матриц-носителей с использованием метода двухфотонной фотополимеризации

С начала 1990-х годов было известно, что воздействие на разные материалы ультракоротких лазерных импульсов, в частности фемтосекундных, значительно эффективнее, нежели воздействие лазерных импульсов большей длительности или лазерного излучения в непрерывных режимах (Kieffer et al., 1989). Во-первых, фемтосекундные лазерные импульсы несут много большую пиковую мощность. В обычных световых источниках света напряженность электрического поля световой волны находится в пределах 1 В/см, так что удлинение диполя при таких воздействиях не превышает 10^{-16} м, много меньше характерных размеров атомов и молекул (10^{-10}~10^{-8} м).

В то же время, напряженность электрического поля световой волны фемтосекундных лазерных импульсах достигает 10^8 В/см, что вполне достаточно для непосредственного разрыва химических связей. С использованием фемтосекундных импульсов легко могут быть запущены различные нелинейные эффекты, в частности многофотонное поглощение, широко используемое при лазерных технологиях обработки материалов. Многофотонное поглощение реализуется лишь в очень малом 3D-объеме в окрестности фокуса. И этот объем не превосходит λ^3, где λ – размер

длины волны. Тем самым при использовании фемтосекундных лазеров может достигаться при точечной экспозиции высокое 3D-пространственное разрешение. Во-вторых, когда материалы находятся под воздействием фемтосекундных лазерных импульсов, энергия фотонов выделяется много быстрее, нежели электроны могли бы передать ее решетке, или атом-молекулярные колебания могли бы ее передать через эмиссию фононов, так что такое возбуждение оказывается как бы «теплоизолирующим» (Saeta et al., 1991). Это обеспечивает идеальность оптического возбуждения в случае фотохимических или фотофизических реакций, для которых трудно-локализуемые термические эффекты крайне нежелательны. В дополнение к этому, у многих диэлектрических материалов существует окно прозрачности в спектральной красной–ближнеинфракрасной области, которое не перекрывается ни электронным зона-зона-поглощением, ни поглощением атом-молекулярных колебаний. Обычно длина волны фемтосекундных лазеров приходится на это окно прозрачности, например 680–1000 нм для титан-сапфирового лазера. Поэтому излучение фемтосекундного лазера может проникать во внутренние области структур, содержащих материал с определенными областями оптической прозрачности и инициировать различные процессы. Фотополимеризация начинается с поглощения кванта света фотоинициатором (*PI*), который распадается с образованием 2 радикалов (*R*•), которые, в свою очередь, разрывают непредельные связи мономера (M_n), обеспечивая постоянное образование радикалов и рост цепи олигомера (RM_n).

$$PI \xrightarrow{h\nu} PI\bullet \rightarrow R\bullet R\bullet + M_n \rightarrow RM_n .$$

Процесс начала полимеризации (сшивки) и последующего роста цепи идентичен как для полимеризации, индуцируемой с помощью традиционных источников света (например УФ-источников и т.д.), так и в случае использования нелинейных эффектов (например 2ФП). Основное отличие этих методов заключается в том, что в первом случае полимеризация инициируется поглощением одного фотона, а во втором – возбуждение происходит при поглощении нескольких фотонов (т.е. при практически одновременном поглощении 2 фотонов, что достигается с использованием ультракоротких лазерных импульсов) (Gittard, Narayan, 2010).

На пространственное разрешение, с которым получаются структуры, оказывает влияние целый ряд факторов, среди которых: размер лазерного пятна, длина волны, мощность лазерного источника, частота и продолжительность лазерного импульса, а также его интенсивность. Если говорить о создании 3-мерных матриц, помимо вышеописанных факторов на линейные размеры структур влияет скорость и погрешность перемещения образца.

Эффект многофотонного поглощения применяется в различных областях технологии, в том числе для создания 3-мерной оптической памяти, изомеризации фотохромных материалов, проведения кавитационных процессов, создания оптических волноводов (Strickler, Webb, 1991, Toriumi et al., 1998, Sun et al., 2000) и т.д. Однако наибольшее распространение этот эффект получил в связи с разработкой метода 2-фотонной полимеризации (2ФП). Оказалось, что с использованием этого метода можно получать структуры с пространственным разрешением порядка 100

нм (Minoshima et al., 2001). При этом для создания таких структур могут применяться композиции, которые подвергаются полимеризации при освещении обычным УФ-светом, хотя механизм возбуждения молекул в обычной полимеризации и 2ФП разный (Ovsianikov et al., 2007). Такой подход позволяет получать скаффолды, избегая термических воздействий на полимерный материал и без использования легколетучих органических растворителей (Scully et al., 1997). Метод 2ФП дает возможность получать объекты с высоким пространственным разрешением, эффективно управлять пористостью получаемых структур, что делает этот метод одним из наиболее перспективных подходов к решению проблемы формирования полимерных матриксов заданной формы для нужд регенеративной медицины (Koroleva et al., 2012b).

Возможности метода 2ФП особенно важны для обеспечения культивирования клеток и транспорта питательных веществ в создаваемых матриксах (Gelinsky et al., 2008). Не менее важным аспектом формирования 3-мерных матриксов для регенеративной медицины является регулирование отношения скоростей формирования живых тканей и скорости биорезорбции синтетических имплантатов (Juodkazis et al., 2009). Если скорость роста тканей будет значительно превышать скорость биорезорбции имплантатов, то произойдет резкое замедление процесса регенерации, поскольку новообразованной ткани будет просто некуда расти. В обратном случае произойдет потеря требуемой архитектоники объекта, что, в свою очередь, приведет к гибели тканеобразующих клеток и разрушению формирующегося межклеточного матрикса. Регулирование скорости биодеградации 3-мерных структур обычно достигается использованием различных соотношений сополимеров, входящих в их состав (Muhammad et al., 2009), или точным регулированием размеров стенок и пор. В то же время, на скорость формирования нативной ткани в организме влияет применение биологически активных соединений, например факторов роста (Hockin et al., 2011).

Наиболее перспективным метод 2ФП выглядит для создания 3-мерных скаффолдов для задач регенерации нервной ткани. Помимо описанных выше общих недостатков методов создания 3-мерных структур (использование органических растворителей, высоких механических и термических нагрузок и т.д.) существуют дополнительные требования, предъявляемы к скаффолдом для восстановления нервной ткани. Известно (Zhao et al., 2013), что размер пор для таких структур не должен быть слишком маленьким (менее 5 мкм), чтобы нервные клетки могли диффундировать внутрь скаффолда, и не должны быть слишком большими (более 100 мкм), чтобы клетки имели возможность высеваться на поверхность структуры. Большинство традиционных методов формирования 3-мерных структур не позволяют напрямую регулировать размеры пор и их распределение в скаффолде, например, при использовании метода электроспиннинга или метода сублимационной сушки (Balendu et al., 2011). Метод 2ФП позволяет варьировать заданную структуру и создавать матрицы с шагом 500 нм. Помимо этого, учитывая возможности послойного создания структур, метод 2ФП позволяет менять внутреннею структуру 3-мерных скаффолдов, что особенно важно при направленной регенерации нервной ткани. Помимо этого на настоящий момент существует еще целый ряд недостатков, не позволяющих использовать предлагаемые методы создания структур

в практической медицине (McAllister et al., 2008; Burdick et al., 2013). Для создания таких структур обычно используются различные синтетические фотополимеризующиеся композиции на основе биосовместимых и биорезорбируюмых полимеров, таких как хитозан, фибрин, гилауроновая кислота и т.д. (Koroleva et al., 2012a,b; Kimberly et al., 2001). Одной из наиболее распространенных основ для создания фоточуствительных композиций является полилактид. Основными его преимуществами является средняя скорость биодеградации в ряду полигликолид-полилактид-поликапролактон. В работе (Koroleva et al., 2013) было показано, что скорость 50% биодеградации микросфер полилактида, введенных в мышечную ткань лабораторных крыс, составляла 35 недель.

Другими материалами для создания 3-мерных скаффолдов являются композиции, содержащие как фрагменты органических веществ (в большинстве случаев содержащие реакционноспособные двойные связи), так и неорганические молекулы. Такие композиции (гибридные системы) предоставляют возможность использования большого круга фотоинициаторов (большинство из которых растворимы в органических растворителях) для проведения процесса 2ФП. Помимо этого у ряда гибридных структур практически не изменяются заданные линейные размеры после проведения процесса 2ФП, в отличие от композиций описанных ранее. Гибридные материалы обладают целым рядом дополнительных преимуществ, прежде всего удобным синтезом, не требующим специальной подготовки, высоким оптическим качеством исходной системы, химической и электрохимической инертностью, хорошей стабильностью во времени. Так, в работе (Bhuian et al., 2006) была проведена сополимеризация алкоксидов кремния и циркония. Полученный материал обладал повышенной механической прочностью. Другим преимуществом гибридных материалов является возможность включения разнообразных функциональных групп с использованием схем синтеза гость–хозяин или боковая цепь – основная цепь. Например, присоединение хромофора, обладающего нелинейно-оптическими свойствами для создания электрооптической системы золь–гель. Например, в работе (Ovsianikov et al., 2008) был осуществлен синтез гибридной системы с помощью процесса золь–гель, содержащей Zr с использованием нижеследующих материалов и этапов синтеза. Метакрилоксипропил триметоксисилан (МОПТМС, 99%, Polyscienceinc.) и метакриловая кислота (МК, 98%, Sigma-Aldrich) были использованы в качестве фотополимеризуемых мономеров. N-пропоксид Zr (ЦПО, 70% в пропаноле, Sigma-Aldrich) и алкоксисилановые группы МОПТМС использовались как части для формирования неогранической матрицы. Различия в реакционной способности алкоксисилановых групп и соли циркония (Zr) предполагают трехстадийный процесс для формирования комбинированных неорганических структур. На первом этапе МОПТМС и ЦПО раздельно гидролизуются и стабилизируются МК. Далее гидролизованный МОПТМС медленно добавляли к комплексу Zr. Гидролиз МОПТМС проводили с использованием 0,01-молярной соляной кислоты в соотношении 1:0,75. Поскольку МОПТМС не смешивается с водой, гидролиз идет в гетерогенной фазе. После 20-минутного перемешивания раствора и добавления метанола гидролиз алкоксисилановых групп был проведен в достаточной мере для перемешивания всех компонентов раствора. Лиганды, обладающие высокой конс-

тантой комплексообразования, иногда используются для контролирования протекания процесса гидролиза и последующей конденсации для прекурсоров металлов (в основном алкоксидов). В нашем случае в качестве лиганда использовалась МК, которая ковалентно связывалась с комплексом Zr через карбоксил. Для выбранной системы использовалось соотношение 1:1, причем добавление МК осуществлялось постепенно, капельным методом. Реакция проходит с образованием комплекса Zr(OC3H7)4-x(МК), поскольку используются эквомолярные количества исходных веществ. По прошествии 45 минут частично гидролизованный МОПТМС добавляли к Zr-комплексу. После перемешивания в течении 45 минут к полученной смеси прибавляли воду в соотношении 2,5:5 эквимолярно. На последнем этапе к смеси прибавляли фотоинициатор 4,4'-бис(диэтиламино)бензофенон в расчете 1% масс. по отношению к массе полученного раствора. После перемешивания в течение 24 часов полученный раствор пропускали через мембрану с диаметром пор 22 мкм. Образцы пленок были приготовлены с помощью спин-коутера на стеклянных подложках. После распределения смеси по подложке в течение 12 часов проводился процесс отжига на плитке при температуре 40°C. При нагреве происходит процесс формирования неорганической матрицы.

Структуры были получены на установке 2-фотонной полимеризации с помощью метода прямого лазерного рисования. В работе использовался Ti-сапфировый лазер (Chameleon, Coherent), позволяющий работать в импульсной системе с продолжительностью импульса 140 фс с частотой 80 МГц и пиком излучения на 780 нм. На установке использовался 100-кратный объектив фирмы Karl Zeiss (Na=1,4). После формирования матрикса внутри гибридной системы проводился процесс вымывания непрореагировавшего материала. Для этого использовался изопропиловый спирт. Процесс проводился в течении 12 часов, после чего образцы помещались в этиловый спирт и хранились в нем. Перед высадкой культур клеток на матриксы их выдерживали 48 часов в стерильном натрий-фосфатном буфере.

Трехмерная модель, выбранная для изготовления скаффолдов, представляла собой квадрат со сторонами 2 мм, состоящий из цилиндров со следующими характеристиками: высота 110 мкм, внутренний диаметр 100 мкм, внешний диаметр 160 мкм (рис. 7). Было создано 3 ряда цилиндров, причем средний ряд цилиндров имел смещение относительно нижнего ряда на 80 мкм. Это было сделано для того, чтобы при заселении матриксов клетками, создать внутреннюю опору для дополнительного закрепления клеточного материала. Размеры матрикса были выбраны специально для проведения экспериментов по высаживанию и росту клеток нервной системы.

Помимо создания биосовместимых структур возможности гибридной золь-гель-технологии позволяют создавать 3-мерные структуры, обладающие проводимостью. Известно (Vivo et al., 2008; Song et al., 2009), что с течением времени в процессе срастания обрубков нервов аксоны при удалении от ближайшего обрубка и органы-мишени, или мышцы, значительно теряют свою способность к регенерации. Поэтому подходы к повышению регенеративной способности нервов являются необходимым условием для полноценного заживления после потери сегмента нервной ткани. Электрическая стимуляция в терапевтических целях на сегодняшний

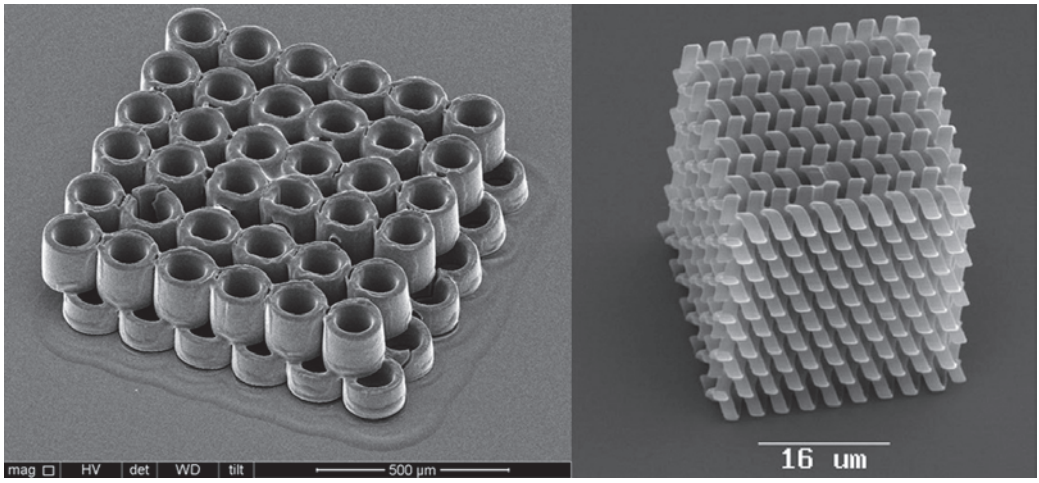


Рис. 7. Изображение типичных скаффолдов полученных методом двуфотонной полимеризации

день является наиболее эффективным стимулятором регенеративных способностей, особенно при восстановлении нервной ткани. Существует большое количество работ, описывающих удлинение нейритов и аксонов *in vitro* и регенерацию нервной ткани *in vivo*. Так, в ряде работ было показано, что электрическая стимуляция при приложении электрического заряда (постоянного или переменного тока) или при создании электрического поля повышает дифференцировку стволовых клеток, ускоряет рост нервной ткани и непосредственно влияет на рост аксонов (Li et al., 2008; Yao et al., 2008). Существует ряд технологий создания токопроводящих биосовместимых материалов, например электрическая стимуляция через электроды обоих концов обрыва нерва, покрытие золотыми наночастицами 3-мерного скаффолда, использование токопроводящих полимеров, таких как полипирол или полианилин (Geremia et al., 2007; Park et al., 2009; Mao et al., 2008; Huang et al., 2008).

В работе (Kurselis et al., 2014) методом 2-фотонной полимеризации были изготовлены матриксы на основе токопроводящих гибридных золь-гель-систем. В качестве исходного соединения для создания таких систем был использован 3,4-этилендиокситиофен (ЭДТ). Основным преимуществом его использования является его биологическая совместимость, оптическая прозрачность, в отличие от других прекурсоров, носителей заряда, которые имеют поглощение в видимой и ближней ИК-области спектра (Balendu et al., 2011). После проведения окислительной полимеризации ЭДТ был получен проводящий, биостабильный и биосовместимый полимер поли(3,4-этилендиокситиофен) (ПЭДТ). В качестве матрицы для 2-фотонной полимеризации был выбран полиэтиленгликоль-диакрилат (ПЕГ-ДА). Этот материал является биосовместимым и может быть использован совместно с фотоинициатором для создания 3-мерных структур. При этом механические свойства фотополимеризованного материала ПЕГ-ДА могут быть изменены при выборе различных олигомеров с разными молекулярными массами. В качестве фотоинициатора был выбран водорастворимый Irgacure 2959 (Ciba). В ходе работ были получены

биологически совместимые 3-мерные скаффолды с разными процентными соотношениями ПЭГ-ДА и ЭДТ. При повышении концентрации ЭДТ для проведения полимеризации требовалось повышение мощности лазера и времени экспозиции образца. Для проведения процесса 2-фотонной полимеризации использовалась вторая гармоника (520 нм) фемтосекундного иттербиевого лазера femtoTRAIN (High Q Laser Production Gmb H, Austria) с частотой 20 МГц и продолжительностью импульса 250 фс. Для получения достаточной доли полимеризованого компонента мощность лазера варьировалась от 6,5 до 20,5 мВ.

Для характеристики электрических свойств полученных микроструктур методом 2ФП были получены 3-мерные стержнеподобные тестовые структуры с двумя большими областями контактов и сегмента с размерами 450×50×50 мкм соответственно. Стоит отметить, что изготовление структур на основе систем, содержащих ПЭДТ в количестве более 17%, было невозможно из-за появления видимых деформаций и недостаточной адгезии структур к подложке. На кривой изменения проводимости видно, что с ростом концентрации ЭДТ значительно возрастает проводимость формированной гибридной системы.

Такой рост проводимости объяснялся авторами с помощью теории перколяции, которая связывает повышение проводимости материала с образованием токопроводящих путей. Концентрацию токопроводящего материала, соответствующую порогу перколяции, обычно называют критическим содержанием проводящего материала. Зависимость проводимости этих двухкомпонентных систем хорошо аппроксимируется функцией подгонки Белехрадека:

$$\sigma \infty \left(p - p_c \right)^t , \tag{1}$$

где σ – электропроводность, p – содержание проводящего наполнителя, p_c – критическое содержание проводящего материала, t – топологический параметр. Топологический параметр характеризует размерность проводящих путей. Исходя из аппроксимации данных на рис. 10 топологический параметр и порог перколяции составили, соответственно, t=1,1 и 5% ПЭДТ. Максимальная проводимость 0,04 См/см достигается при максимальной концентрации ПЭДТ 17% по объему. Таким образом, в работе была показана возможность формирования биостабильных матриксов на основе токопроводящих гибридных систем ПЭГ-ДА/ПЭДТ методом 2ФП. Проводимость такого материала достигала 0,04 См/см при максимальной концентрации ЭДТ 17% об., что дает возможность использовать изготовленные структуры для регенерации нервных тканей.

Таким образом, основным преимуществом метода 2ФП является возможность получения пространственных структур с высоким пространственным разрешением и заданной архитектоникой. Полимеры, которые используются для создания матриксов, могут обладать разными свойствами, в том числе быть проводящими, биодеградируемыми и др. За счет изменения архитектоники метод 2ФП позволяет получать скаффолды, обладающие различными механическим свойствами, изменяемыми в широком диапазоне.

5. Исследование токсичности и биосовместимости полимерных пористых матриксов при культивировании шванновских клеток

Биологическая совместимость матриц оценивалась с использованием культуры клеток Шванна, полученных из седалищного нерва самцов крыс линии Вистар. Использована фотополимеризующаяся композиция на основе модифицированного полилактида, полученного в результате поэтапного синтеза. На первом этапе была получена разветвленная структура, содержащая предельно замещенный атом углерода с четырьмя молекулами лактида. Далее было проведено метакрилирование полученной структуры при проведении реакции с ангидридом метакриловой кислоты. Для создания фоточувствительной композиции на последней стадии предварительного синтеза к системе добавляли инициатор Irgacure 359 (Ciba) в количестве 2% масс. Для создания 3-мерных структур использовался Ti:сапфировый лазер – 120 фс, 80 МГц и длина волны 780 нм. Выделениие шванновских клеток проводят из срезов седалищного нерва. Срезы нерва инкубировали в растворе коллагеназы (Sigma, UK) 60 минут при 37°C. Полученная суспензия клеток фильртруется через фильтр с диаметром пор 40 мкм (Becton Dickinson, USA) и центрифугируется 5 минут при 400 g. Полученную клеточную массу промывают средой ДМЕМ, содержащая 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Полной ростовой средой является среда ДМЕМ (D-валин) (PAA, UK), содержащая 2 mM глутамина, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, добавку N2 (Gibco BRL, UK), 20 мг/мл экстракта бычьего гипофиза, 5 μM форсколина (Sigma-Aldrich, UK), 100 мкг/мл пенициллина (или 100 мкг/мл стрептомицина) и 0,25кг/мл амфотерицина B. Суспензию клеток высевали в чашке Петри 35 мм, предварительно покрывали 0,01-процентным раствором поли-L-лизина (Sigma-Aldrich, UK). Через 7 дней культивирования проводилось иммуноцитохимическое окрашивание маркера глиальных клеток S-100β и DAPI. Биологическая совместимость оценивалась по трем основным параметрам: пролиферация шванновских клеток (в 1-е, 3-и и 7-е сутки культивирования), жизнеспособность клеток (МТТ-редуктазный тест), морфология клеток (с использованием электронной и конфокальной микроскопии). Для изучения морфологии клеток и наличия функциональных связей проводили иммуноцитохимическое окрашивание актинового цитоскелета с помощью фаллоидина и винкулина (для детекции клеточных контактов).

Изучена скорость роста шванновских клеток на полимерных пленках и 3-мерных структурах, полученных методом 2-фотонной фотополимеризации. Скорость роста клеток на полимерных пленках и 3-мерных структурах не отличима от скорости роста контрольных культур на всех (1-е, 3- и 7-е сутки) сроках развития культур. Исследование жизнеспособности клеток с помощью МТТ-редуктазного теста также не показало значимых различий между группами. Морфологию клеточных культур на поверхности полимерного матрикса оценивали с помощью сканирующей электронной и конфокальной микроскопии. На рис. 8 представлены электронные микрофотографии клеток Шванна на скаффолде, созданном на основе полилактида (на рис. 9 и 10 аналогичные микрофотографии сделаны с помощью кофокального микроскопа). На рис. 8 видно, что морфология шванновских клеток

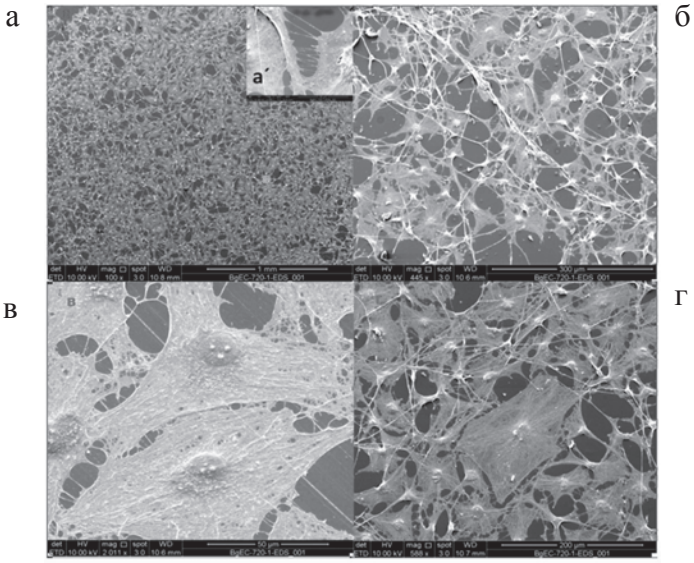


Рис. 8. Микрофотографии, полученные в санирующем электронном микроскопе, роста клеток Шванна на пленках фотополимеризующийся композиции на основе полилактида, полученные с разным разрешением: (а) 100× (шкала 1 мм) с вставкой (а') 4000× (шкала 30 мкм), (б) 445× (шкала 300 мкм), (в) 2011× (шкала 50 мкм) и (г) 588× (шкала 200 мкм)

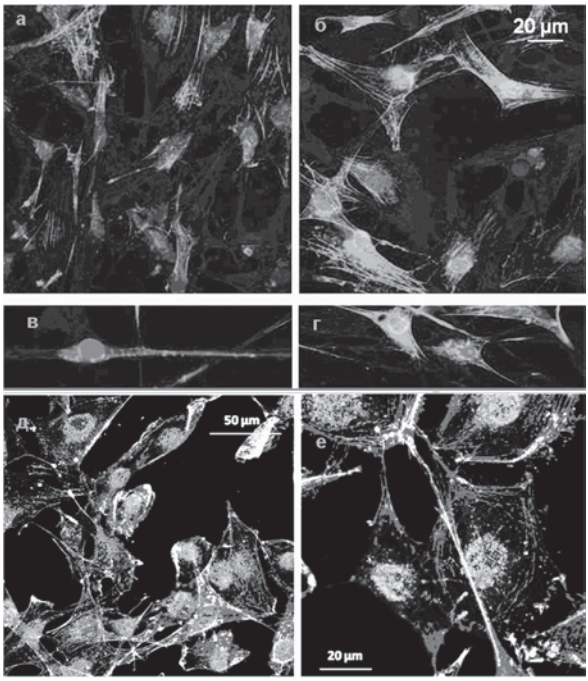


Рис. 9. Конфокальные микрофотографии клеток Шванна на поверхности фотополимеризованного полилактида: окрашенные TRITC-фаллоидином (красный цвет, филаменты актина) и DAPI (синие, ядра) (а-г); окрашенные TRITC-фаллоидином (для маркировки актиновых филаментов, зеленый), DAPI (синие, ядра), винкулином (для оценки образования фокального контакта, красный) (д, е)

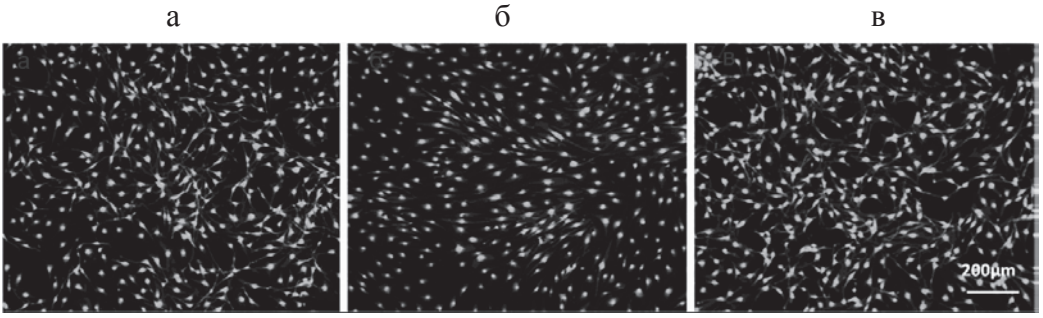


Рис. 10. Иммуномечение клеток Шванна на стекле (а), пластике, покрытом поли-л-лизином (б), и полилактиде (в)

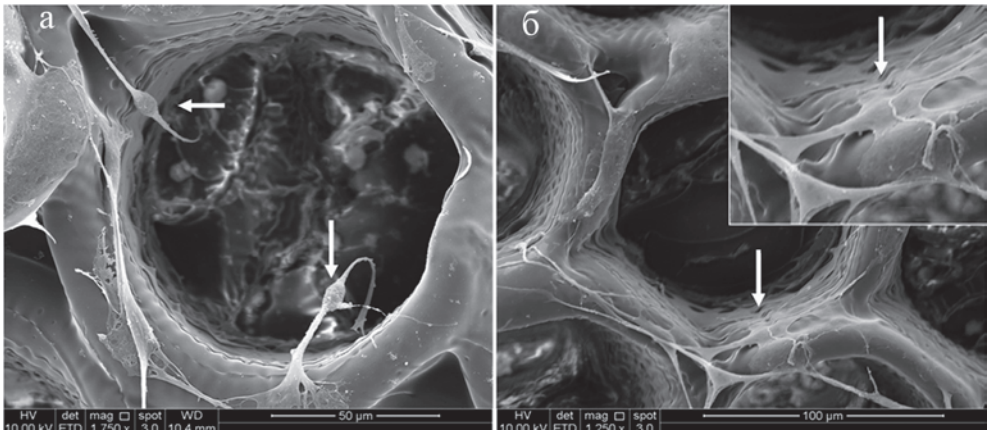


Рис. 11. Микрофотографии СЭМ роста клеток Шванна на 3-мерных матрицах: (а) увеличение 1750×, шкала 50 мкм и (б) увеличение 1250×, шкала 100 мкм. На изображениях видно наличие плоских и веретенообразных клеток

на поверхности пористых биополимеров неоднородна, наряду с распластанными трехполюсными клетками с большой поверхностью в культуре наблюдается большое количество веретеновидных клеток. Распластанная морфология является нехарактерной для шванновских клеток, однако исследование цитоскелета показало наличие в подобных клетках хорошо организованного цитоскелкта и межклеточных контактов. Также было показано, что шванновские клетки способны расти на 3-мерных полимерных конструкциях (рис. 11), создавая специфические морфологические комплексы внутри полимерных структур. Нами использовались матрицы с диаметром пор от 80 до 200 мкм. Клетки способны расти на боковых поверхностях микротрубочек скаффелда, либо, не прикрепляясь, падать на дно полимерной конструкции. Полученные результаты свидетельствуют об успешном росте глиальных клеток на всех типах исследованных структур. Особенности морфологии шванновских клеток на поверхности полимера говорят о высокой адгезивности и биосовместимости материала.

6. Исследование *in vitro* биосовместимости матриксов на основе гибридной золь-гель-полимерной системы, содержащей Zr, полученных методом двухфотонной фотополимеризации

Для исследования биосовместимости матриксов были выбраны материалы, полученные методом двухфотонной фотополимеризации на основе гибридной золь-гель-полимерной системы, содержащей цирконий. Скаффолд представлял собой квадрат со сторонами 2 мм, состоящий из цилиндров со следующими характеристиками: высота 110 мкм, внутренний диаметр 100 мкм, внешний диаметр 160 мкм. Клеточным материалом являлись первичные культуры клеток гиппокампа, полученные от 18 дневных эмбрионов мышей линии C57BL/6.

Диссоциирование нервных клеток достигалось путем обработки ткани гиппокампа 0,25-процентным трипсином. Клетки ресуспендировали в нейробазальной среде NeurobasalTM (Invitrogen) в комплексе с биоактивной добавкой B27 (Invitrogen), глутамином (Invitrogen), эмбриональной телячьей сывороткой (ПанЭко). Диссоциированные клетки гиппокампа культивировали на матриксе, согласно разработанному протоколу (Мухина и др., 2009, Vedunova et al., 2013), в течение 14 дней *in vitro* (DIV). Контролем служили диссоцированные клетки гиппокампа, культивируемые на стеклах в тех же условиях. Жизнеспособность культур поддерживалась в CO_2-инкубаторе при температуре 35,5°C, в газовой смеси, содержащей 5% CO_2. Структуру и динамику развития культур оценивали с помощью инвертированного микроскопа DM1000 (Leica, Германия).

Оценка биосовместимости осуществлялась по динамике роста диссоциированной культуры клеток гиппокампа в течение 14 дней развития *in vitro* и по параметрам морфо-функционального состояния сформировавшихся на матриксах нейронглиальных сетей, которые регистрировали с помощью метода функционального мультиклеточного нейроимиджинга с применением кальций-специфичного флуоресцентного маркера Oregon Green 488 BAPTA-1 AM (OGB1). Известно, что кратковременное увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме клетки является сигнальным процессом, запускающим различные каскады биохимических реакций. Ca^{2+}-активность нервных клеток – это способность нейронов и глии быстро изменять содержание цитоплазматического Ca^{2+} в виде осцилляций. Спонтанная Ca^{2+}-активность в клетках формируется при активации ионотропных и метаботропных рецепторов, ионных каналов и регулируется работой белков — транспортеров (Sipila et al., 2006). Таким образом, оценка изменения внутриклеточной концентрации ионов кальция выполняет роль надежного показателя функциональной активности нейронных сетей и свидетельствует о биосовместимости молекул полимерного матрикса и клеток нервной ткани. В работе был использован лазерный сканирующий конфокальный микроскоп LSM 510 (Carl Zeiss, Германия). Анализ Ca^{2+}-осцилляций, полученных при помощи флуоресцентной конфокальной микроскопии, проводили с помощью оригинального программного пакета «Astroscanner». Анализировались записи функции F(t) зависимости средней интенсивности флуоресценции OGB1 выделенной области поля (совпадающей с телом клетки) от времени. Для

определения времени начала и конца осцилляции был взят порог отклонения от среднего значения в размере стандартной квадратичной ошибки F(t). Полученные данные отражали количество Ca^{2+}-осцилляций в минуту и их длительность (Захаров и др., 2012).

В ходе анализа динамики роста диссоциированной культуры клеток гиппокампа в течение 14 дней развития *in vitro* с помощью инвертированного микроскопа DM1000 (Lieca, Германия) были выявлены основные закономерности развития, характерные для нормального формирования нейронных сетей первичных диссоциированных культур. В конце первых суток культивирования жизнеспособные клетки прикреплялись в большом количестве на матриксы. Начиная со второго дня культивирования наблюдалось образование на поверхности субстрата сложных сплетений растущих отростков нервных и глиальных клеток, интенсивные процессы роста нейронов и глии, соединение клеток между собой многочисленными отростками (рис. 12), подобно клеткам, которые культивировались на стеклах (Гладков и др., 2011) . Образованные нейронные сети культуры сохраняли жизнеспособность в течение месяца, что говорит об отсутствии токсического действия данного полимера на клетки мозга. На рис. 13 представлен кальциевый флуоресцентный имиджинг диссоциированной культуры гиппокампа эмбрионов мышей (E18) на гибридных полимерных матриксах на 14-й день развития *in vitro*.

Проведенные исследования функциональной активности нейронов показали появление спонтанных кальциевых осцилляций в диссоциированных культурах гиппокампа, выращенных на матриксах-носителях, на 14-й день культивирования *in vitro*, что свидетельствовало о формировании полноценной функциональной активности нейронной сети культивируемых клеток на гибридных полимерных матриксах (рис. 14).

Длительность осцилляций составила от 5 до 12 с, частота – 0,9–2,0 (рис. 15) осцилляций в минуту. Наличие в диссоцированных культурах клеток гиппокампа спонтанных изменений содержания внутриклеточного кальция свидетельствовало

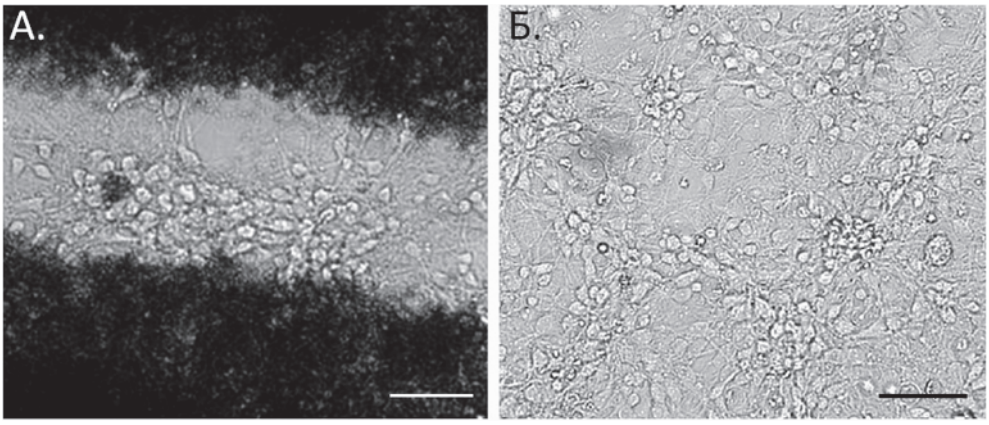


Рис. 12. Диссоциированная культура гиппокампа эмбрионов мышей (E18) на (А) гибридном полимерном матриксе и (Б) стекле на 14 день развития *in vitro.* Масштаб 50 мкм

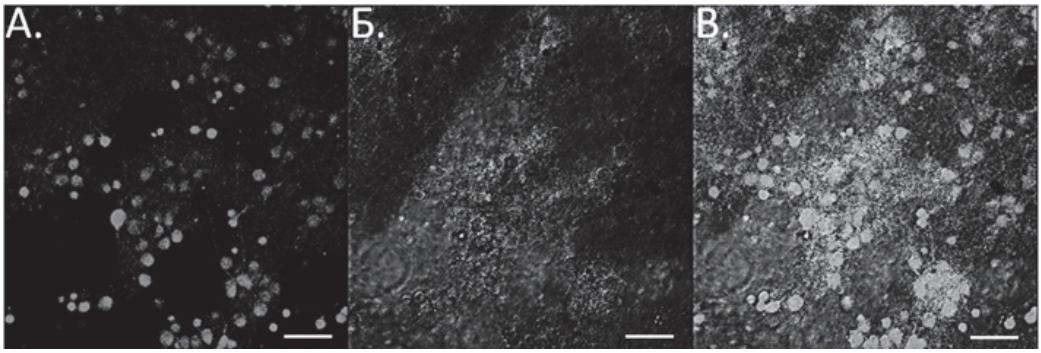


Рис. 13. Кальциевый флуоресцентный имиджинг диссоциированной культуры гиппокампа эмбрионов мышей (E18) на гибридных полимерных матриксах на 14-й день развития *in vitro*. А – флуоресцентный канал, Б – канал проходящего света, В – совмещенный имиджинг. Масштаб 50 мкм

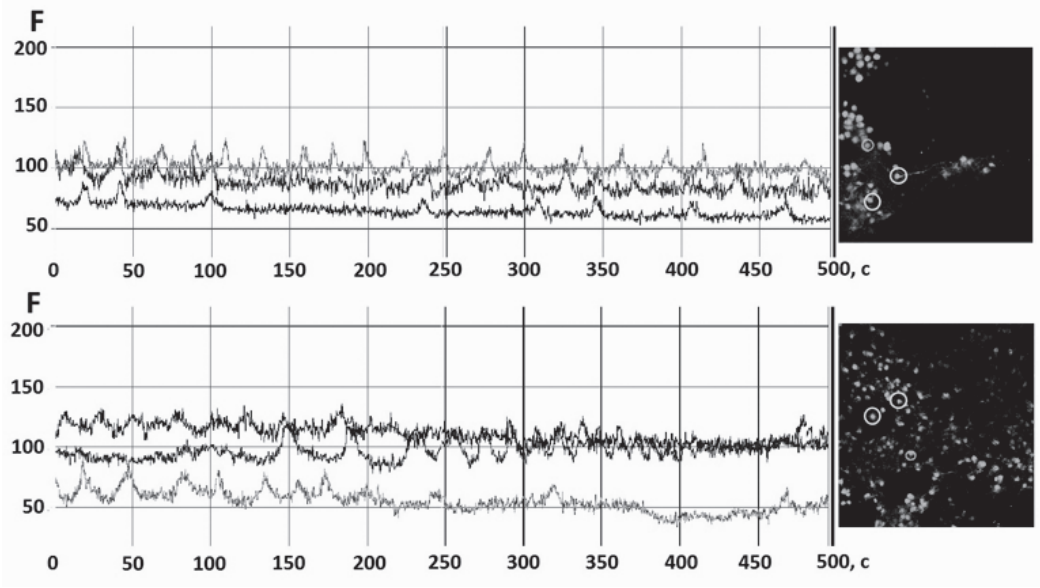


Рис. 14. Характерный профиль кальциевой активности клеток 2-х первичных культур гиппокампа на 14-й день развития *in vitro* на гибридных полимерных матриксах. По оси абсцисс – время, с, по оси ординат – интенсивность флуоресценции, усл. ед

о нормальном развитии культуры *in vitro*, соответствующем типичному для данного срока функционального онтогенеза (10–14 DIV) (Митрошина и др., 2011; Широкова и др., 2013).

С использованием лазерной флуоресцентной конфокальной микроскопии были построены 3D-изображения нейрон-глиальной сети, сформировавшейся на гибридных полимерных матриксах (рис. 16). Было доказано, что матриксы обладают

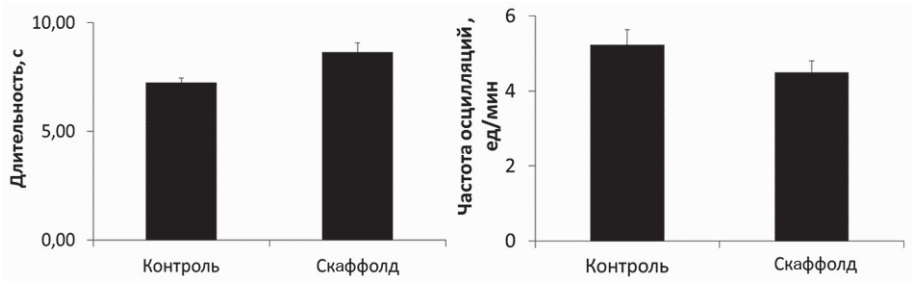


Рис. 15. Длительность и частота Ca^{2+}-осцилляций нейронов на 14-й день развития *in vitro*. Контроль – культивирование диссоциированных клеток гиппокампа на стеклах, покрытых полиэтиленимином; скаффолд – культивирование диссоциированных клеток гиппокампа на гибридных полимерных матриксах

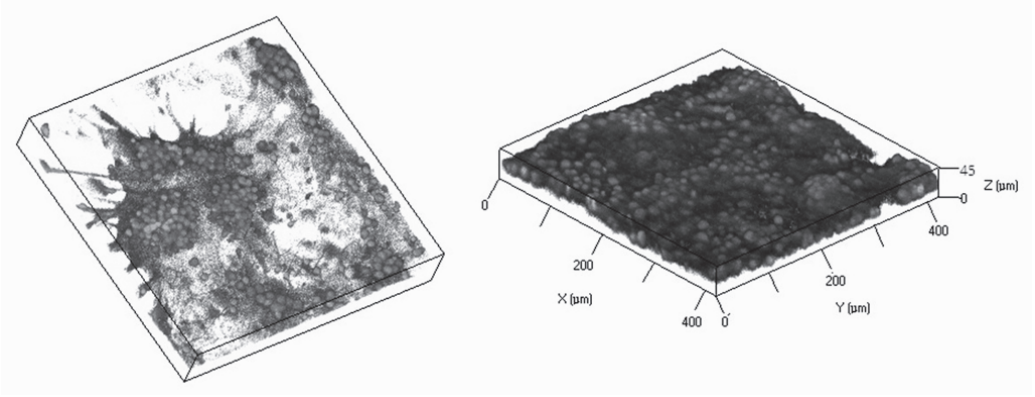


Рис. 16. Трехмерная реконструкция флуоресцентного имиджинга диссоциированной культуры гиппокампа эмбрионов мышей (E18) на гибридных полимерных матриксах на 14-й день развития *in vitro*

хорошей адгезивной способностью, сохраняют прикрепившиеся при посадке нервные клетки, стимулируют рост их отростков.

7. Заключение

В заключение отметим, что задача создания биосовместимых и биодеградируемых скаффолдов для нейротрансплантации является значимым направлением современной регенеративной медицины. Решению этой проблемы посвящен целый ряд статей и монографий, опубликованных с начала XXI века в ведущих мировых журналах. Представленные здесь методы позволяют варьировать химический состав, архитектонику и ряд других физико-химических свойств матриксов, которые могут влиять на способность клеток нервной системы адгезироваться и создавать функциональные конгломераты на поверхности. Проведенные исследования *in vitro*

показали, что пористые гибридные полимерные матриксы, полученные с использованием метода двухфотонной фотополимеризации, не токсичны для клеток нервной системы, имеют высокую адгезивность к дифференцированным клеткам нервной системы и могут быть использованы для создания сложных многокомпонентных нейротрансплантатов. Полученные результаты открывают новые возможности в создании новых инновационных биодеградируемых тканеинженерных конструкций для различных задач нейротрансплантации. Разнообразие полученных конструкций дает возможность создания как пористых многокомпонентных структур для заместительной терапии головного мозга, так и твердых каркасов для коррекции нарушений с необходимостью механической поддержки.

Литература

Астасидис А., Ярыгин К.Н., Русских С.В., Бурунова В.В., Лупатов А.Ю., Ярыгин Н.В., Миронов С.П., Ярыгин В.Н. Разработка методов посттравматической регенерации спинного мозга на основе применения новейших методов регенеративной медицины, в том числе клеточных технологий, усовершенствованных методов реконструктивной микрохирургии и наноматериалов // Хирург. 2009. № 11. С. 5-12.

Брюховецкий И.С., Дюйзен И.В., Мотавкин П. Морфохимическая характеристика спинного мозга крыс после торакальной сегментэктомии и трансплантации полимерного коллагенового нейроматрикса «сферогель-э»™ с инкорпорированными обкладочными нейроэпителиальными клетками // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2008. Т. 3. № 2. С. 57-62.

Гладков А.А., Ведунова М.В., Коротченко С.А., Захаров Ю.Н., Балашова А.Н., Мухина И.В. Развитие пространственно-временной структуры нейрональной сети гиппокампа *in vitro* // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. 2011. Вып. 2. № 2. С. 243-248.

Захаров Ю.Н., Митрошина Е.В., Ведунова М.В. и др. Флуоресцентный анализ паттернов метаболической активности нейрон-глиальной сети // Оптический журнал. 2012. Т. 79. № 6. С. 47-51.

Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Широкова О.М. и др. Оценка динамики функционального состояния диссоциированной культуры гиппокампа in vitro // Вестник ННГУ им. Н.И. Лобачевского. 2011. Вып. 2. № 2. С. 283-286.

Мухина И.В., Казанцев В.Б., Хаспеков Л.Г. и др. Мультиэлектродные матрицы – новые возможности в исследовании пластичности нейрональной сети // Современные технологии в медицине. 2009. № 1. С. 8.

Попов В.К., Антонов Е.Н, Баграташвили Н., Евсеев А.В., Панченко В.Я. Лазерные технологии быстрого прототипирования для изготовления индивидуальных имплантатов и матриц для тканевой инженерии // Альманах клинической медицины. Ред. В.И. Шумский. М.: МОНИКИ, 2006. Т. XII. С. 127.

Попов В.К., Евсеев А.В., Антонов Е.Н. и др. Лазерные технологии изготовления индивидуальных имплантатов и матриц для тканевой инженерии // Оптический журнал. 2007. Т. 74. № 9. С. 636-640.

Федяков А.Г., Древаль О.Н., Кузнецов А.В. и др. Экспериментальное обоснование применения гелевого имплантата «сферо®гель» и пленочного имплантата «эластопоб»® при травме периферической нервной системы в эксперименте // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2009. Т. 11. № 4. С. 75-80.

Широкова О.М. , Фрумкина Л.Е., Ведунова М.В. и др. Закономерности развития нейронных сетей в диссоциированных культурах клеток гиппокампа // Современные технологии в медицине. 2013. Т. 5. № 2. С. 6-13.

Álvarez Z., Castaño O., Castells A.A. et al. Neurogenesis and vascularization of the damaged brain using a lactate-releasing biomimetic scaffold // Biomaterials. 2014. Vol. 35. № 17. P. 4769-4781.

Anderson J.M., Shive M.S. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres // Adv. Drug. Deliv. Rev. 1997. Vol. 28. P. 5-24.

Antonov E.N., Bagratashvili V.N., Howdle S.M. et al. Fabrication of polymer scaffolds for tissue engineering using surface selective laser sintering // Laser Physics. 2006. Vol. 16. P. 774-787.

Baier Leach J., Bivens K.A., Patrick C.W. et al. Photocrosslinked hyaluronic acid hydrogels: natural, biodegradable tissue engineering scaffolds // Biotechnol. Multimodal approaches for regenerative stroke therapies: combination of granulocyte colony-stimulating factor with bone marrow mesenchymal stem cells is not superior to G-CSF alone // Front. Aging Neurosci. 2014. Jun 23. Vol. 6. P. 130. doi: 10.3389/fnagi.2014.00130. eCollection 2014.

Bhasin A., Srivastava M.V., Mohanty S. et al. Stem cell therapy: a clinical trial of stroke // Clinical Neurology and Neurosurgery. 2013. Vol. 115. № 7. P. 1003-1008.

Bhuian B., Winsfield R.J., O'Brien S., Crean G.M. Investigation of the Two-Photon polimerisation of a Zr-based inogranic organic hibrid material system // J. Appl. Surf. Sci. 2006. Vol. 252. P. 4845-4849.

Bible E., Chau D.Y., Alexander M.R., Price J., Shakesheff K.M., Modo M. Attachment of stem cells to scaffold particles for intra-cerebral transplantation // Nat. Protoc. 2009. Vol. 4. № 10. P.1440-1453.

Burdick J.A., Mauck R.L., Gorman J.H. 3rd, Gorman R.C. Acellular biomaterials: an evolving alternative to cell-based therapies // Sci. Transl. Med. 2013. Vol. 5. P. 176. 176ps4. doi: 10.1126/scitranslmed.3003997.

Chan T.M., Harn H.J., Lin H.P. et al. The use of ADSCs as a treatment for chronic stroke // Cell Transplant. 2014. Vol. 23. № 4-5. P. 541-547.

Chen J., Venkat P., Zacharek A., Chopp M. Neurorestorative therapy for stroke // Front. Hum. Neurosci. 2014. Jun 27. Vol. 8. P. 382. doi: 10.3389/fnhum.2014.00382. eCollection 2014.

Cheng N.C., Chang H.H., Tu Y.K., Young T.H. Efficient transfer of human adipose-derived stem cells by chitosan/gelatin blend films // J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater. 2012. Vol. 100. № 5. P. 1369-1377.

Cigognini D., Silva D., Paloppi S., Gelain F. Evaluation of mechanical properties and therapeutic effect of injectable self-assembling hydrogels forspinal cord injury // J. Biomed. Nanotechnol. 2014. Vol. 10. № 2. P. 309-323.

Cui X., Chen L., Ren Y., JiY., Liu W., Liu J., Yan Q., Cheng L., Sun Y.E. Genetic modification of mesenchymal stem cells in spinal cord injury repair strategies // Biosci. Trends. 2013. Vol. 7. № 5. P. 202-208.

Dudas B., Semeniken K. Glycosaminoglycans and neuroprotection // Handb. Exp. Pharmacol. 2012. Vol. 207. P. 325-343.

El-Kassaby A.W., Retik A.B., Yoo J.J., Atala A. Urethral stricture repair with an off-the-shelf collagen matrix // J. Urol. 2003 Vol. 169. № 1. P. 170-173.

Gatskiy A.A., Tretyak I.B., Tsymbaliuk V. Biocompatible heterogeneous porous gel matrix NeuroGel(TM) promotes regeneration of rat sciatic nerve within tubular silicone prosthesis (experimental study) // Acta Neurochir. (Wien). 2014. Vol. 156. № 8. P. 1591-1598.

Gelinsky M., Welzel P.B., Simon P., Bernhardt A., Konig U. Porous three-dimensional scaffolds made of mineralised collagen: Preparation and properties of a biomimetic nanocomposite material for tissue engineering of bone // Chemical Engineering J. 2008. Vol. 137. P. 84-96.

Geremia N.M., Gordon T., Brushart T.M., Al-Majed A.A., Verge V.M.K. Electrical stimulation promotes sensory neuron regeneration and growth-associated gene expression // Exp. Neurol. 2007. Vol. 205. № 2. P. 347-359.

Gittard S.D., Narayan R.J. Laser direct writing of micro- and nano-scale medical devices // Expert. Rev. Med. Devices. 2010. Vol. 7. № 3. P. 343-356.

Griffith L.G. Polymeric biomaterials // Acta Materialia. 2000. Vol. 48. № 1. P. 263-277.

Gunatillake P.A., Adhikari R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering // Cells and Materials. 2003. Vol. 5. P. 1-16.

Hao L., Zou Z., Tian H., Zhang Y., Zhou H., Liu L. Stem cell-based therapies for ischemic stroke // Biomed. Res. Int. 2014. P. 468748. doi: 10.1155/2014/468748. Epub 2014 Feb 26.

Honmou O., Houkin K., Matsunaga T. et al. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke // Brain. 2011. Vol. 134. № 6. P. 1790-1807.

Huang L., Zhuang X., Hu J., Lang L., Zhang P., Wang Y. Synthesis of biodegradable and electroactive multiblock polylactide and anilinepentamer copolymer for tissue engineering applications // Biomacromolecules. 2008. Vol. 9. № 3. P. 850-858.

Hutmacher D.W., Sittinger M.,. Risbud M.V. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems // Trends in Biotechnology. 2004. Vol. 22. P. 354-362.

Im W, Kim M. Cell Therapy Strategies vs. Paracrine Effect in Huntington's Disease // J. Mov. Disord. 2014. Vol. 7. № 1. P. 1-6.

Ishiai S. Rehabilitation for patients with cerebral infarction after transplantation of autologous human mesenchymal stem cells // Rinsho Shinkeigaku. 2013. Vol. 53. № 11. P. 1177-1179.

Jha B.S., Colello RJ., Bowman J.R., Sell S.A. et al. Two pole air gap electrospinning: Fabrication of highly aligned, three-dimensional scaffolds for nerve reconstruction // Acta Biomater. 2011. Vol. 7. № 1. P. 203 -215.

Jiang Y., Zhu W., Zhu J., Wu L., Xu G., Liu X. Feasibility of delivering mesenchymal stem cells via catheter to the proximal end of the lesion artery in patientswith stroke in the territory of the middle cerebral artery // Cell Transplant. 2013. Vol. 22. № 1. P. 2291-2298.

Johnson T., Bahrampourian R., Patel A., Mequanint K. Fabrication of highly porous tissue-engineering scaffolds using selective spherical porogens // Biomed. Mater. Eng. 2010. Vol. 20. № 2. P.107-118.

Juodkazis S., Mizeikis V., Misawa H. Effect of refractive index-mismatch on laser microfabrication in silica glass // J. Appl. Phys. 2009. 106 051101.

Kaewkhaw R., Scutt A.M., Haycock.J.W. Anatomical site influences the differentiation of adipose-derived stem cells for Schwann-cell phenotype and function // Glia. 2011. Vol. 59. P. 734-749.

Kalladka D., Muir K.W. Brain repair: cell therapy in stroke // Stem. Cells Cloning. 2014. Vol. 21. № 7. P. 31-44. doi: 10.2147/SCCAA.S38003. eCollection 2014. Review.

Kanczler J.M., Mirmalek-Sani S-H., Hanley N.A. et al. Biocompatibility and osteogenic potential of human fetal femur-derived cells on surface selective laser sintered scaffolds // Acta Biomaterialia. 2009. Vol. 5. P. 2063-2071.

Kieffer J.C., Matte J.P., Belair S., Chaker M. et al. Absorption of an ultrashort laser pulse in very steep plasma density gradients // IEEE J Quantum Elect. 1989. Vol. 25. P. 2640.

Kim M.S., Park S.J., G .B.K., Kim C.H. Inter-connecting pores of chitosan scaffold with basic fibroblast growth factor modulate biological activity on human mesenchymal stem cells // Carbohydrate Polymers. 2012. Vol. 87. № 4. P. 2683-2689.

Kim M., Park S.R., Choi B.H. Biomaterial scaffolds used for the regeneration of spinal cord injury (SCI) // Histol. Histopathol. 2014. [Epub ahead of print] Review.

Koroleva A., Gill A.A., Ortega I., Haycock J.W. et al. Two-photon polymerization-generated and micromolding-replicated 3D scaffolds for peripheral neural tissue engineering applications // Biofabrication. 2012a. Vol. 4. № 2. P. 025005.

Koroleva A., Gittard S., Schlie S., Deiwick A., Jockenhoevel S., Chichkov B. Fabrication of fibrin scaffolds with controlled microscale architecture by a two-photon polymerization–micromolding technique // Biofabrication. 2012b. Vol. 4. № 1. P. 015001. doi: 10.1088/1758-5082/4/1/015001. Epub 2012 Jan 18.

Koroleva A., Kufelt O., Schlie-Wolter S., Hinze U., Chichkov B. Laser microstructured biodegradable scaffolds // Biomed. Tech. (Berl). 2013a. Vol. 58. № 5. P. 399-405. doi: 10.1515/bmt-2013-0036.

Koroleva A., Kufelt O., Schlie-Wolter S., Hinze U., Chichkov B. Laser microstructured biodegradable scaffolds // Biomed. Tech. 2013b. DOI 10.1515/bmt-2013-0036.

Kotwal A., Schmidt C.E. Electrical stimulation alters protein adsorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials // Biomaterials. 2001. Vol. 22. № 10. P. 1055e64.

Kurselis K., Kiyan R., Bagratashvili V., Popov V., Chichkov B. 3D Fabrication of All-Polymer Conductive Microstructures by Two Photon Polymerization. 2014 в печати.

Le Maitre C.L., Freemont A.J., Hoyland J.A. Localization of degradative enzymes and their inhibitors in the degenerate human intervertebral disc // J. Pathol. 2004. Vol. 204. P. 47-54.

Leach J.B., Bivens K.A., Collins C.N., Schmidt C.E. Development of photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering // J. Biomed. Mater. Res. A. 2004. Vol. 70. № 1. P. 74-82.

Li G., Zhang L., Wang C., Zhao X. et al. of silanization on chitosan porous scaffolds for peripheral nerveregeneration // Carbohydrate Polymers. 2014. Vol. 101. P. 718-726.

Li L., El-Hayek Y.H., Liu B., Chen Y., Gomez E., Wu X. Direct-current electrical field guides neuronal stem. progenitor cell migration // Stem. Cells. 2008. Vol. 26. № 8. P. 2193-2200.

Li M., Liu X., Yue H., Xiong W., Gu J., Xu M. Transplantation of N -acetyl aspartyl-glutamate synthetase-activated neural stem cells after experimental traumatic brain injury significantly improves neurological recovery // Cell Physiol. Biochem. 2013. Vol. 32. № 6. P. 1776-1789.

Lumiaho J., Heino A., Tunninen V. et al. New bioabsorbable polylactide ureteral stent in the treatment of ureteral lesions: an experimental study // J. Endourology. 1999. Vol. 13. № 2. P. 107-112.

Madigan N., Chen B., Knight A.M., et al. Comparison of cellular architecture, axonal growth and blood vessel formation through cell-loaded polymer scaffolds in the transected rat spinal cord // Tissue Eng. Part A. 2014. [Epub ahead of print].

Mao C., Zhu A., Wu Q., Chen X., Kim J., Shen J. New biocompatible polypyrrole-based films with good blood compatibility and high electrical conductivity // Colloids Surf. B Biointerfaces. 2008. Vol. 67. № 1. P. 41-45.

McAllister T.N., Dusserre N., Maruszewski M., L'Heureux N. Cell-based therapeutics from an economic perspective: primed for a commercial success or a research sinkhole? // Regen Med. 2008. Vol. 3. P. 925-937.

Minoshima K., Kowalevicz A.M., Hartl I., Ippen E.P., Fujimoto J.G. Photonic device fabrication in glass by use of nonlinear materials processing with a femtosecond laser oscillator // Opt. Lett. 2001. Vol. 26. № 19. P.1516-1518.

Mooney D.J., D.F. Baldwin D.F., Suh N.P., Vacanti J.P., R. Langer R. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents // Biomaterials. 1996. Vol. 17. P. 1417-1422.

Morgan R.H., Srivastava A.K. Clinical relevance of stem cell therapies in amyotrophic lateral sclerosis // Neurol. India. 2014. Vol. 62. № 3. P. 239-248.

Muhammad Iqbal Sabir Xiaoxue Xu. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue // J. Mater. Sci. 2009. Vol. 44. P. 5713-5724.

Mummery C.L., Davis R.P., Krieger J.E. Challenges in using stem cells for cardiac repair // Sci. Transl. Med. 2010. Apr 14. Vol. 2. № 27. P. 27ps17. doi: 10.1126/scitranslmed.3000558.

Nazarov R., Jin H.J., Kaplan D.L. Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin // Biomacromolecules. 2004. Vol. 5. № 3. P. 718-726.

Olive P.L., Banath J.P., Durand R.E. Heterogeneityin radiation-induced DNA damage and repair in tumour and normal cells measured using the comet assay // Radiat. Res. 1990. Vol. 122. P. 86-94.

Ovsianikov A., Ostendorf A., Chichkov B.N. Three-dimensional photofabrication with femtosecond lasers for applications in photonics and biomedicine // Appl. Surface Science. 2007. Vol. 253. P. 6599-6602.

Ovsianikov A., Viertl J., Chichkov B. et al. Ultra-low shrinkage hybrid photosensitive material for two-photon polymerization microfabrication // ACS Nano. 2008. Vol. 2. № 11. P. 2257-2262.

Park J.S., Park K., Moon H.T. et al. Electricalpulsed stimulation of surfaces homogeneously coated with gold nanoparticles to induce neurite out growth of PC12 cells // Langmuir. 2009. Vol. 25. № 1. P. 451-457.

Popov V.K., Evseev A.V., Antonov E.N. et al. Laser technologies for fabricating individual implants and matrices for tissue engineering // J. Optical Technology. 2007. Vol. 74. № 9. P. 636-640.

Saeta P., Wang J.K., Siegal Y., Bloembergen N., Mazur E. Ultrafast femtosecond laser melting of GaAs // Phys. Rev. Lett. 1991. Vol. 67. P. 1023.

Schwend T.I., Deaton R.J., Zhang Y., Caterson B., Conrad G.W. Corneal sulfated glycosaminoglycans and their effects on trigeminal nerve growth cone behavior in vitro: roles for ECM in cornea innervation // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2012. Vol. 53, № 13. P. 8118-8137.

Scully M.O., Zubairy M.S. Quantum Optics. UK, Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1997.

Sipilä S.T., Huttu K., Voipio J., Kaila K. Intrinsic bursting of immature CA3 pyramidal neurons and consequent giant depolarizing potentials are driven by a persistent Na+ current and terminated by a slow Ca2+ -activated K+ current // Eur. J. Neurosci. 2006. Vol. 23. P. 2330-2338.

Smeds K.A., Pfister-Serres A., Miki D. et al. Photocrosslinkable polysaccharides for in situ hydrogel formation // J. Biomedical Materials Res. 2001. Vol. 54. P. 115-121.

Song J.W., Yang L.J., Russell S.M. Perepheral nerve: what's new in basic science laboratories // Neurosurg. Clin. Nam. 2009. Vol. 20. № 1. P. 121e31.

Stabenfeldt S.E., Munglani G., García A.J., LaPlaca M.C. Biomimetic microenvironment modulates neural stem cell survival, migration, and differentiation // Tissue Eng. Pt. A. 2010. Vol. 16. № 12. P. 374737-374758.

Strickler J.H., Webb W.W. Three-dimensional optical data storage in refractive media by two-photon point excitation // Opt. Lett. 1991. Vol. 16. P. 1780-1782.

Sun H.B., Juodkazis S., Watanabe M., Matsuo S., Misawa H., Nishii J.J. Generation and recombination of defects in vitreous silica induced by irradiation with a near-infrared femtosecond laser // J. Phys. Chem. B. 2000. Vol. 104. № 15. P. 3450-3455.

Sun M., Downes S. Physicochemical characterisation of novel ultra-thin biodegradable scaffolds for peripheral nerve repair // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2009. Vol. 20. P. 1181-1192.

Tajiri N., Duncan K., Antoine A., Pabon M. et al. Stem cell-paved biobridge facilitates neural repair in traumatic brain injury // Front Syst. Neurosci. 2014. Jun 24. Vol. 8. P. 116. doi: 10.3389/fnsys.2014.00116. eCollection 2014.

Toriumi A., Kawata S., Gu M. Reflection confocal microscope readout system for three-dimensional photochromic optical data storage // Opt. Lett. 1998. Vol. 23. P. 1924-1926.

Tsang V.L., Bhatia S.N. Three-dimensional tissue fabrication // Adv. Drug. Deliv. Rev. 2004. Vol. 56. № 11. P. 1635-1647.

Vedunova M., Sakharnova T., Mitroshina E. et al. Seizure-like activity in hyaluronidase-treated dissociated hippocampal cultures // Frontiers in cellular neuroscience. 2013. Vol. 7 (article 149). doi: 10.3389/fncel.2013.00149.

Vivo M., Puigdemasa A., Casals L., Asensio E., Udina E., Navarro X. Immediate electrical stimulation enhances regeneration and reinnervation andmodulates spinal plastic changes afters ciatic nerve injury and repair // Exp. Neurol. 2008. Vol. 211. № 1. P.180-193.

Woerly S., Doan V.D., Sosa N., de Vellis J., Espinosa-Jeffrey A. Prevention of gliotic scar formation by NeuroGel allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord // J. Neurosci. Res. 2004. Vol. 75. № 2. P. 262-272.

Xu H.H., Weir M.D., Simon C.G. Injectable and Strong Nano-Apatite Scaffolds for Cell/Growth Factor Delivery and Bone Regeneration // Dental Materials. 2008. Vol. 24. № 9. P. 1212-1222.

Yang S., Leong K.F., Du Z., Chua C.K., The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors // Tissue Eng. 2001. Vol. 7. P. 679-689.

Yao L., Shanley L., Mccaig C., Zhao M. Small applied electric fields guide migration of hippocampal neurons // J. Cell Physiol. 2008. Vol. 216. № 2. P. 527-535.

Yi J.H., Katagiri Y., Susarla B., Figge D, Symes AJ, Geller HM. Alterations in sulfated chondroitin glycosaminoglycans following controlled cortical impact injury in mice // J. Comp. Neurol. 2012. Vol. 520. № 15. P. 295-313.

Zhao B., Sun X., Li X., Yang Q., Li Y., Zhang Y., Li B., Ma X. Neuroscience Letters Improved preparation of acellular nerve scaffold and application of PKH26 fluorescent labeling combined with in vivo fluorescentimaging system in nerve tissue engineering // Neurosci. Lett. 2013. Vol. 556. P. 52-57.

Zustiak S.P., Pubill S., Ribeiro A., Leach J.B. Hydrolytically degradable poly(ethylene glycol) hydrogel scaffolds as a cell delivery vehicle: characterization of PC12 cell response // Biotechnol. Prog. 2013. Vol. 29. № 5. P. 1255-1264.

Перспективы применения лентивирусной трансдукции клеток мозга для доставки генов нейротрофинов в область «полутени» ишемического очага

Г.Р. Тухбатова, М.В. Гуляев, М.М. Свинов, П.М. Балабан, С.В. Саложин

В Российской Федерации ежегодно регистрируется более 450 000 случаев острого нарушения мозгового кровообращения (ОМНК). По распространенности данная патология находится на втором месте после сердечно-сосудистой патологии. Ранняя 30-дневная летальность после ОМНК составляет 34,6%, а в течение года умирают около половины больных. Инсульт является лидирующей причиной инвалидизации населения. Лишь около 20% выживших больных могут вернуться к прежней работе. Причинами острого нарушения кровообращения могут быть закупорка мозговых кровеносных сосудов (ишемический инсульт), разрыв мозговых кровеносных сосудов (геморрагический инсульт) (Moskowitz, 2010).

Ишемический инсульт наиболее распространен, на его долю выпадает 70–85% всех случаев острого нарушения мозгового кровообращения. При падении скорости кровотока в месте закупорки сосуда до 10–20% от нормы в течение нескольких минут происходят необратимые изменения в нейронах и формируется центральная зона инфаркта («ядро ишемии», англ. *core*), до 20–40% – формируется «ишемическая полутень», или «пенумбра» (англ. *penumbra*), в этой области нейроны морфологически не изменяются, но с течением времени они погибают, увеличивая тем самым область ишемии (Lipton, 1999).

Важной стратегией развития регенеративной постинсультной терапии является разработка и внедрение препаратов, направленных на стимуляцию нейротрофической поддержки клеток в поврежденных областях мозга. Нейротрофины (neurotrophin, греч. neuron – нерв, trophe – питание) – семейство секретируемых белков, отвечающих за рост отростков нервных клеток, дифференцировку, выживаемость и выполняющих свои функции путем связывания с Trk-рецептором (*tropomyosinreceptorkinase*), трансмембранным рецептором тирозинкиназы.

Семейство нейротрофинов включает в себя фактор роста нервов (NGF, nerve growth factor), мозговой нейротрофический фактор (BDNF, brain-derived neurotrophic factor), нейротрофин-3 и другие. Благодаря способности увеличивать выживаемость нейронов, нейротрофины рассматриваются как перспективные антинейродегенеративные средства (Allen et al., 2013). BDNF особенно привлекателен в этом отношении, так как он улучшает выживание и предупреждает дегенерацию популяций нейронов, вовлеченных в такие заболевания, как амиотрофический ла-

---

Сокращения: ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ДСГ – дорсальный спинной ганглий; ОМНК – острое нарушение мозгового кровообращения; BDNF – мозговой нейротрофический фактор; NGF – фактор роста нервов.

теральный склероз (мотонейроны), сенсорные нейропатии (сенсорные нейроны), болезнь Альцгеймера (базальные холинергические нейроны переднего мозга), болезнь Паркинсона (дофаминергические нейроны черной субстанции). Кроме того, показано, что BDNF играет важную роль в этиологии болезни Хантингтона и депрессии.

Фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF) выделяется клетками периферической и центральной нервной системы. Основными мишенями для NGF являются холинергические нейроны переднего мозга, играющие значительную роль в таких функциях ЦНС, как внимание, обучение, память, и большинство нейронов симпатической нервной системы (Gnahn et al, 1983; Barde, 1989; Alderson et al., 1990; Lewin, Barde, 1996). Мозговой нейротрофический фактор (Brain-derived neurotrophic factor, BDNF) способствует выживаемости нейронов дорсального спинного ганглия (ДСГ) в культуре и препятствует их гибели, если вводится *in vivo* эмбрионам во время периода естественной гибели нейронов. Популяциями клеток, чувствительными к BDNF, являются дофаминергические нейроны черной субстанции, мотонейроны, нейроны реснитчатого ганглия, ГАМК-ергические нейроны переднего, промежуточного мозга и стриатума, нейроны гиппокампа, некоторые сенсорные нейроны периферической нервной системы, холинергические нейроны переднего мозга. Рецепторы факторов роста являются гликопротеинами, встроенными в плазматическую мембрану. Нейротрофины взаимодействуют с двумя типами рецепторов на поверхности нейронов-мишеней: тирозинкиназным и p75-рецепторами.

Существует большой объем данных по нейропротекторным эффектам нейротрофинов в животных моделях нейродегенеративных заболеваний. Есть сведения, что NGF и BDNF вовлечены в патогенез таких заболеваний, как болезни Альцгеймера и Паркинсона. BDNF продемонстрировал значительные эффекты в ряде животных моделей бокового амиотрофического склероза и ишемии. Кроме того, BDNF оказал довольно сильный положительный эффект в моделях инсульта, что является сейчас крайне важным его свойством, остро востребованным в сегодняшней фармакологической практике (Apfel et al., 1994; Zhang, Partridge, 2001). Также есть данные, что NGF влияет не только на нейроны, но и на эндотелиальные клетки мозговых капилляров (вместе они образуют нейроваскулярную единицу) и способствует их более быстрому восстановлению после ишемического повреждения (Lecht et al., 2010). BDNF защищает от дефицита пространственной памяти, возникающей после гипоксии–ишемии у новорожденных (Almli et al., 2000). Недавно стало очевидно, что BDNF играет важную роль в долгосрочном потенциировании синаптической пластичности. Предполагается, что он также может играть определенную роль в образовании памяти и извлечении, проявляет антидепрессивную активность (Minichiello, 2009; Spedding, Gressens, 2008). Есть данные о том, что при выполнении физических упражнений после перенесенного инсульта происходит увеличение количества BDNF и его высокоаффинного рецептора TrkB в контралатеральном полушарии, тем самым доказывая участие BDNF в пластичности (Kim et al., 2005).

Таким образом, при всем широком спектре действия нейротрофинов одним из самых важных является нейропротекторное действие, способствующее восстанов-

лению нейронов после повреждения. Эта их особенность способствует развитию и совершенствованию терапевтических подходов в лечении таких заболеваний, как инсульт мозга, болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, боковой амиотрофический склероз и ряд других.

Отдельной задачей является доставка нейротрофинов к поврежденным клеткам. Дело в том, что их размер не позволяет проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Существуют технологии доставки белка к клеткам: к белкам присоединяют агент, способствующий проникновению через ГЭБ (Partridge et al., 1994; Zhang, Partridge, 2001). Есть работа, в которой делали инъекции нейротрофина (NGF) напрямую в мозг (в мозговые желудочки) для осуществления нейропротекции в модели фокальной ишемии мозга, осуществляемой пережатием средней мозговой артерии, но действие нейротрофина в таком случае оказалось неэффективным (Kent et al., 1999). Существуют и технологии доставки гена нейротрофина в клетку, с которого осуществляется экспрессия белка самой клеткой. Доставка гена осуществляется кодирующей плазмидой, проникновение которой в клетку можно осуществить *in vivo* электропорацией (Wang et al., 2013; DeVry et al., 2010) с использованием наносистем (O'Mahony et al., 2013), генной пушки (Sato et al., 2000). Одним из удачных решений этой задачи является лентивирусная *in vivo* трансдукция клеток мозга, обеспечивающая долгосрочную экспрессию белка за счет встраивания гена нейротрофина в геном клетки мозга, тем самым обеспечивая ощутимый нейропротекторный эффект.

В частности, есть данные о том, что BDNF, доставленный лентивирусными частицами в латеральные желудочки мозга новорожденных мышей, имеет нейропротективное действие в модели эксайтотоксичности, вызванной NMDA (Bemelmans et al., 2006). Доставка нейротрофинов NGF и BDNF с помощью адено-ассоциированных вирусных частиц в стриатум приводит к мягким функциональным улучшениям моторных нарушений, проявляющимся через 3–5 недель после инсульта, которые сочетаются с небольшим, но важным увеличением выживаемости дорсолатеральных нейронов стриатума (Andsberg et al., 2002). BDNF, доставленный адено-ассоциированными вирусными частицами за 2 недели в латеральные желудочки мозга крыс, уменьшал объем повреждения в модели инсульта, вызванного пережатием средней мозговой артерии в течение 30 минут, а также при его добавлении к нейронам за 2 дня увеличивал количество выживших гиппокампальных нейронов в культуре после удаления сыворотки (Zhang et al, 2011). NGF, BDNF, GDNF, доставляемые вирусом сендай в латеральные желудочки мозга песчанок, предотвращают отсроченную гибель пирамидных нейронов в поле CA1 гиппокампа после кратковременного обширного инсульта. Причем нейропротективное действие всех трех факторов NGF, BDNF, GDNF обнаруживается при введении после 30 минут, отсчитанных от начала реперфузии, и только NGF и GDNF имеют нейропротективное действие при введении после 4 и 6 часов (Shirakura et al., 2004).

В данной работе мы сфокусировали внимание на нейропротекции нейронов в области «полутени» ишемического очага, возникающего при ишемическом инсульте в коре больших полушарий мозга лабораторных животных, осуществляемой нейротрофинами, доставленными лентивирусными частицами. В частности, мы

подобрали оптимальные параметры для осуществления тромбоза мозговых кровеносных сосудов с целью получения 50-процентной глубины повреждения от всей глубины коры, осуществили лентивирусную трансдукцию клеток коры больших полушарий мозга крыс, подобрав предварительно оптимальные условия (Тухбатова и др., 2011), оценили объем инъекции, определили тип клеток, подвергшихся трансдукции.

В качестве модели ишемии был выбран фотохимический тромбоз кровеносных сосудов мозга, вызванный коагуляцией красителя «Бенгаловый розовый» под действием лазера. При подборе условий было использовано от 15 до 50% мощности лазера. Оценку объема повреждения проводили на 2-й, 4-й, 9-й, 15-й дни методом магнитно-резонансной томографии (томограф Bruker Biospec 70/30, с индуктивностью магнитного поля 7 Тл).

В результате были подобраны условия экспериментальной ишемии, при которых происходит повреждение 50% (по глубине) коры больших полушарий (рис. 1).

По данным МРТ, с течением времени область «ядра» и «полутени» прогрессивно уменьшаются. Область полутени после 5 суток выражена очень слабо (рис. 2).

При большом увеличении можно увидеть, что в области «полутени» на 2-й день после тромбоза мозговых сосудов появляются темные, пикнотические, набухшие нейроны. Также происходит отек–набухание нейропиля (рис. 3, 4).

Таким образом, согласно данным МРТ и гистологического окрашивания, с течением времени область «ядра» и «полутени» прогрессивно уменьшается. Область полутени через 5 суток уменьшается в 2 раза, а после 5 суток выражена очень слабо. Можем сделать вывод, что самый оптимальный срок для оценки действия нейротрофических факторов на данной модели ишемии – 1–5 суток.

Суспензию лентивирусных частиц делали по отработанному протоколу (Тухбатова, 2011). Инъекции лентивирусной суспензии осуществляли крысам-самцам линии Вистар. Животных оперировали в стереотаксическом приборе (Kopf, США). Делали саггитальный разрез на коже головы длиной 2–3 см. Верхнюю поверхность

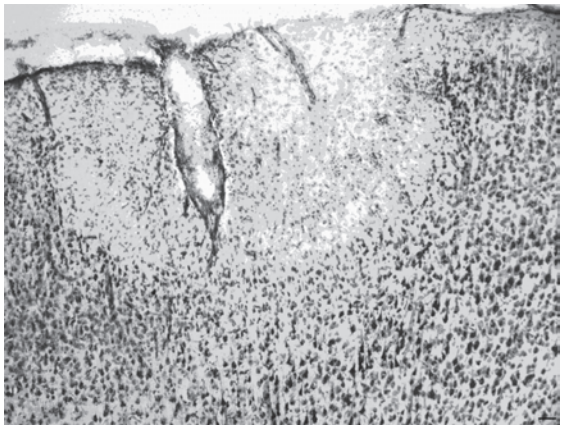


Рис. 1. Повреждение коры (светлая полукруглая область от верхнего края до середины рисунка) больших полушарий на 2-й день после фотохимического тромбирования

Окраска по Нисслю. Масштаб 50 мкм

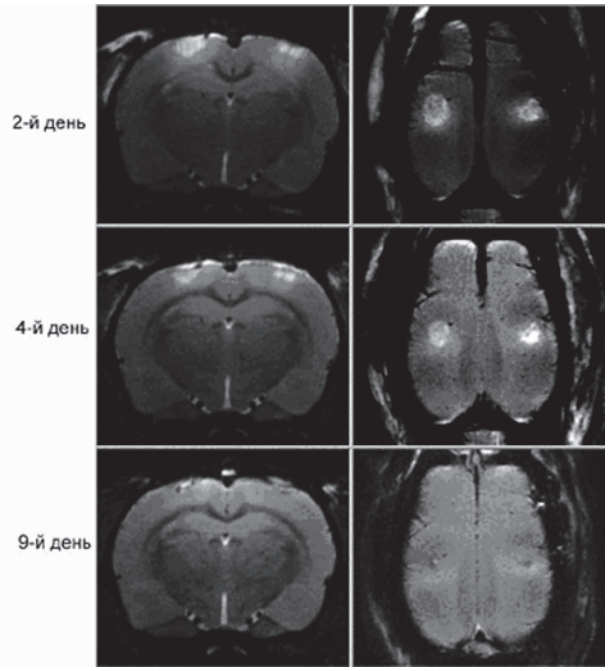


Рис. 2. Оценка объема повреждения с помощью магнитно-резонансной томографии на 2-й, 4-й, 9-й день после экспериментальной ишемии

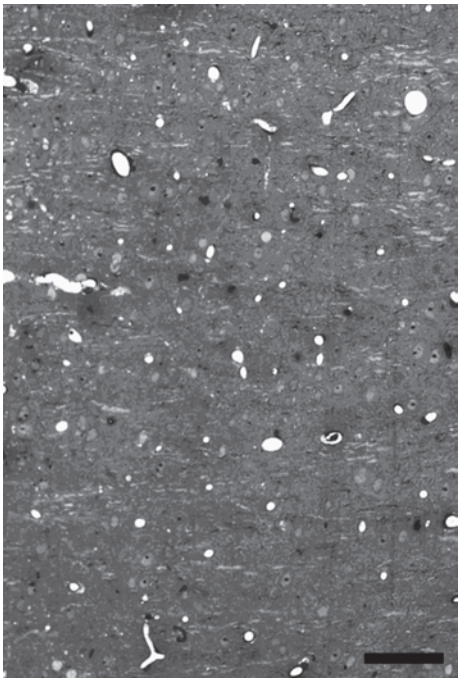


Рис. 3. Интактная область коры больших полушарий. Окраска по Нисслю. Масштаб 50 мкм

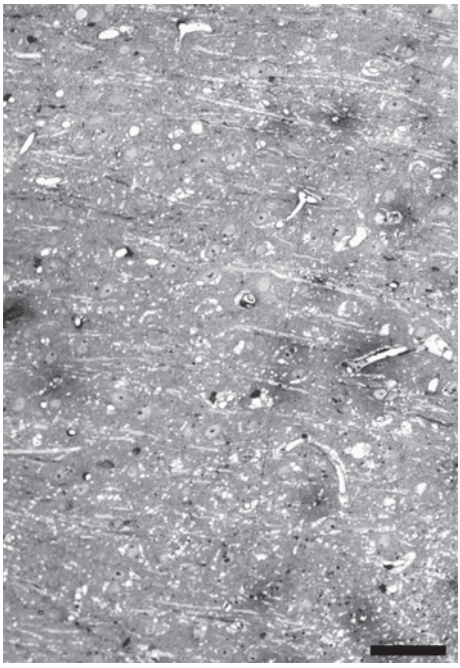


Рис. 4. Область «полутени», отек тел нейронов и нейропиля.
Окраска по Нисслю. Масштаб 50 мкм

очищали от надкостницы. Трепанировали кость ручным трепаном (диаметр 3,1 мм) в области сенсомоторной коры, кость во внутреннем диаметре истончали бором до тех пор, пока не просматривались кровеносные сосуды. Выбирался участок, свободный от сосудов, делалось отверстие миллиметровым в диаметре сверлом. Суспензии лентивирусов (V=2 мкл) вводили с помощью наноинжектора (скорость подачи 0,5 мкл/мин) в кору больших полушарий, глубина 0,7 мм от поверхности мозга.

Для иммуногистохимического окрашивания готовили срезы мозга экспериментальных животных. Через 2 недели после осуществления инъекции лентивирусными частицами крыс анестезировали, мозг фиксировали методом транскардиальной перфузии 4-процентным параформальдегидом в 0,1 М фосфатно-солевом буфере. Затем мозг извлекали и оставляли для дофиксации в 4-процентном растворе параформальдегида в течение 24 часов. Срезы мозга толщиной 50 мкм делали на вибратоме LeicaVT 1200S.

Срезы отмывали в 300 мкл раствора PBS+0,05% Tween три раза по 10 минут. Отбирали и добавляли 500 мкл смеси PBS+0,05% Tween+5% сыворотка (normal goat serum, NGS, MPBiomedicals), инкубировали 1 час для блокировки неспецифического связывания антител в дальнейшем. Отбирали и добавляли первичные антитела кролика на зеленый флуоресцентный белок в растворе PBS+1% сыворотка (rabbitanti-GFP, Life Technologies, USA), инкубировали ночь при +4ºС. После инкубации с первичными антителами делали 3 раза отмывку срезов по 10 минут на

качалке в 1 мл смеси PBS и 0,05% Tween. Добавляли вторичные антитела козы на антитела кролика (goatanti-rabbit, Life Technologies, USA), образцы заворачивали в фольгу и инкубировали 3 часа на качалке. Отбирали антитела и делали 3 раза отмывку срезов по 10 минут в 1 мл смеси PBS и 0,05% Tween на качалке. Образцы помещали в среду, предотвращающую выцветание (Slow Fade Gold, Invitrogen). Препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа LeicaDM6000B, фотографии получили с помощью камеры LeicaDFC310FX.

Для определения количества белка нейротрофинов (в частности фактора роста нервов, ФРН) через две недели после инъекции лентивирусных частиц в гиппокамп крыс использовали иммуноферментный анализ (ELISA). Образцы гомогенизировали в ледяном буфере для гомогенизации, супернатант был перенесен в лунки 96-луночного планшета с преконъюгированными антителами к ФРН. После инкубации при +4ºС супернатант был удален и лунки промыты 5 раз буфером для отмывок. Первичные антитела мыши против ФРН были разведены 1:1000 непосредственно перед использованием и 100 мкл антител было помещено в каждую лунку. После инкубации (37ºС, 3 часа на шейкере) лунки планшета промывали 5 раз буфером для отмывок. Вторичные антитела осла против антител мыши были разведены 1:1000 непосредственно перед использованием. Инкубацию и отмывки проводили аналогично тому, что делали с первичными антителами. Затем 100 мкл TBM/E раствора (Millipore) помещали в каждую лунку. После инкубации 10 минут в лунки добавляли раствор для остановки реакции. Окрашивание оценивали с помощью Wallac Victor планшетного спектрофотометра.

В результате проведенных исследований было продемонстрировано, что инъекция суспензии лентивирусных частиц, несущих генетическую информацию для синтеза фактора роста нервов, увеличивает концентрацию ФРН в гиппокампе в 2 раза.

Таким образом, было получено подтверждение того, что полученную суспензию можно использовать в дальнейших экспериментах при моделировании нейропатологии.

В результате экспериментов по введению суспензии вирусных частиц, несущих генетический материал для экспрессии фактора роста нервов, нами продемонстрировано, что распространение лентивирусных частиц в коре больших полушарий по объему составляет в среднем 800 (ростро-каудальное направление), 1500 (дорсо-вентральное), 700 (медиа-латеральное) мкм (рис. 5). После двойного окрашивания срезов (на GFP и маркеры нейрональных/глиальных клеток) нами было установлено, что при этом происходит преимущественная трансдукция глиальных клеток (рис. 6, 7).

Таким образом, мы показали, что довольно большой объем коры трансдуцируется лентивирусными частицами, преимущественно трансдуцируются глиальные клетки. Этот факт позволяет предположить, что глиальные клетки, находящиеся в поврежденном участке и продуцирующие нейротрофины, доставленные лентивирусными частицами, смогут внести вклад в восстановление поврежденных нейронов, а сами нейроны не будут нести дополнительной нагрузки по осуществлению синтеза нейротрофинов. Следующим этапом исследования будет сравнительный анализ нейропротекторной активности нейротрофинов NGF, BDNF, GDNF.

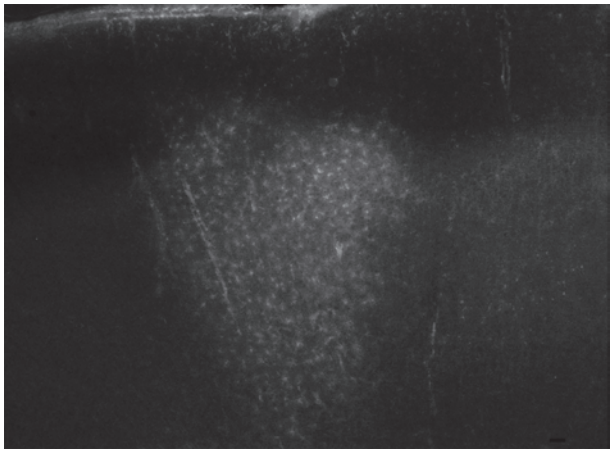


Рис. 5. Окраска антителами на зеленый флуоресцентный белок (GFP) в месте инъекции лентивирусных частиц в коре больших полушарий мозга крыс.

Масштаб 50 мкм (место инъекции окрашено белым)

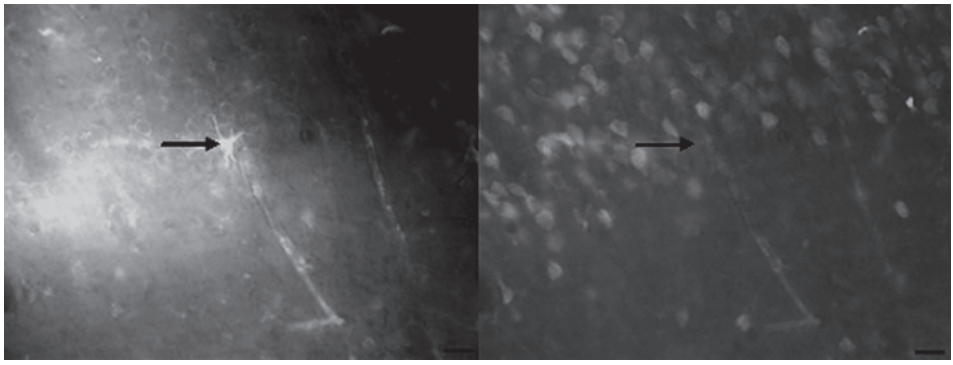


Рис. 6. Окраска антителами на зеленый флуоресцентный белок (GFP) (слева), окраска антителами на ядерный белок нейронов (NeuN) (справа).

Стрелкой показана клетка, окрашенная на GFP и не окрашенная на NeuN. Масштаб 50 мкм

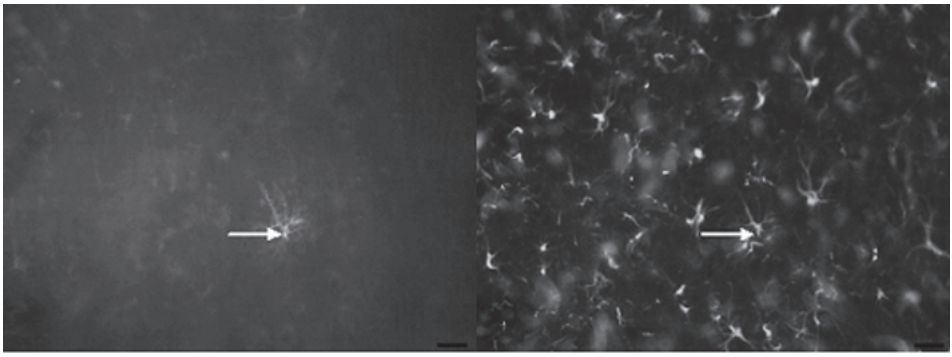


Рис. 7. Окраска антителами на зеленый флуоресцентный белок (GFP) (слева), окраска антителами на глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP) (справа).

Стрелкой показана клетка, окрашенная на GFP и GFAP. Масштаб 50 мкм

До настоящего момента не осуществлялось попыток доставить нейротрофины непосредственно в область «полутени» ишемического очага к нейронам, в которых, как считается, запускается механизм апоптоза и на которые, как мы предполагаем, могут повлиять нейротрофины с целью увеличения их выживаемости. Это комплексная задача, решение которой состоит из множества этапов. В нашей работе мы осуществили первые этапы: создали воспроизводимую модель ишемии, создали лентивирусные частицы, локально увеличивающие уровень нейротрофинов. Следующий непростой этап – это осуществить доставку нейротрофинов именно в зону «полутени» и оценить уровень нейропротекции, осуществляемую нейротрофинами.

Литература

Тухбатова Г., Кулешова Е., Степаничев М., Иванов А., Саложин С. Оптимизация метода получения лентивирусных частиц для трансдукции нейронов invivo // Нейрохимия. 2011. Т. 28. № 4. С. 333-339.

Alderson R., *Alterman A., Barde Y.* Nerve growth factor increases survival and differentiated functions of rat septal cholinergic neurons in culture // Neuron. 1990. Vol. 5. P. 297-306.

Allen S., *Watson J., Shoemark D. et al.* GDNF, NGF and BDNF as therapeutic options for neurodegeneration // Pharmacol. Ther. 2013. Vol. 138. P. 155-175.

Almli C., *Levy T., Han B. et al.* BDNF protects against spatial memory deficits following neonatal hypoxia-ischemia // Exp. Neurol. 2000. Vol. 166. P. 99-114.

Andsberg G., *Kokaia Z., Klein R. et al.* Neuropathological and behavioral consequences of adeno-associated viral vector-mediated continuous intrastriatal neurotrophin delivery in a focal ischemia model in rats // Neurobiol. Dis. 2002. Vol. 9. P. 187-204.

Apfel S., *Arezzo J., Brownlee M. et al.* Nerve growth factor administration protects against experimental diabetic sensory neuropathy // Brain Res. 1994. Vol. 14. P. 7-12.

Barde Y. Trophic factors and neuronal survival // Neuron. 1989. Vol. 6. P. 1525-1534.

Bemelmans A., *Husson I., Jaquet M. et al.* Lentiviral-mediated gene transfer of brain-derived neurotrophic factor is neuroprotective in a mouse model of neonatal excitotoxic challenge // J. Neurosci. Res. 2006. Vol. 83. P. 50-60.

De Vry J., *Martínez-Martínez P., Losen M. et al. In vivo* electroporation of the central nervous system: a non-viral approach for targeted gene delivery. Prog Neurobiol. 2010. Vol. 92. P. 227-244.

Gnahn H., *Hefti F., Heumann R. et al.* NGF mediated increase of choline acetyltransferase (ChAT) in the neonatal rat forebrain: evidence for a physiological role of NGF in the brain // Brain Res. 1983. Vol. 285. P. 45-52.

Kent T., *Quast M., Taglialatela G. et al.* Effect of NGF treatment on outcome measures in a rat model of middle cerebral artery occlusion // J. Neurosci. Res. 1999. Vol. 55. P. 357-369.

Kim M., Bong M., Han T. et al. Exercise increased BDNF and TrkB in the contralateral hemisphere of the ischemic rat brain // Brain Res. 2005. Vol. 1052. P. 16-21.

Lecht S., *Arien-Zakay H., Marcinkiewicz C. et al.* Nerve growth factor-induced protection of brain capillary endothelial cells exposed to oxygen-glucose deprivation involves attenuation of Erk phosphorylation // J. Mol. Neurosci. 2010. Vol. 41. P. 183-192.

Lewin G., *Barde Y.* Physiology of the neurotrophins // Annu. Rev. Neurosci. 1996. Vol. 19. P. 289-317.

Lipton P. Ischemic cell death in brain neurons // Physiol. Rev. 1999. Vol. 79. P. 1431-1568.

Minichiello L. TrkB signalling pathways in LTP and learning // Nat. Rev. Neurosci. 2009. Vol. 10. P. 850-860.

Moskowitz M., Lo E., Iadecola C. The science of stroke: mehanisms in search of tretments // Neuron. 2010. Vol. 67. P. 181-198.

O'Mahony A., Godinho B., Cryan J., O'Driscoll C. Non-viral nanosystems for gene and small interfering RNA delivery to the central nervous system: formulating the solution // J. Pharm. Sci. 2013. Vol. 102.

P. 3469-3484.
Partridge W., Kang Y., Buciak J. Transport of human recombinant brain-derived neurotrothic factor (BDNF) through the rat blood-brain barrier in vivo using vector-mediated peptide drug delivery // Pharm. Res. 1994. Vol. 11. P. 738-46.
Sato H., *Hattori S., Kawamoto S. et al.* In vivo gene gun-mediated DNA delivery into rodent brain tissue // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2000. Vol. 270. P. 163-170.
Shirakura M., *Inoue M., Fujikawa S. et al.* Postischemic administration of Sendai virus vector carrying neurotrophic factor genes prevents delayed neuronal death in gerbils // Gene Ther. 2004. Vol. 11. P. 784-90.
Spedding M., *Gressens P.* Neurotrophins and cytokines in neuronal plasticity // Novartis. Found. Symp. 2008. Vol. 289. P. 222-233.
Wang X., *Chang L., Guo Z. et al.* Neonatal SVZ EGFP-labeled cells produce neurons in the olfactory bulb and astrocytes in the cerebral cortex by in-vivo electroporation // Neuroreport. 2013. Vol. 24. P. 381-387.
Zhang Y., *Partridge W.* Neuroprotection in transient focal brain ishemia after delayed intravenous administration of brain-derived neurotrophic factor conjugated to a blood-brain barrier drug targeting system // Stroke. 2001. Vol. 32. P. 1378-1384.
Zhang J., *Yu Z., Yu Z. et al*. rAAV-mediated delivery of brain-derived neurotrophic factor promotes neurite outgrowth and protects neurodegeneration in focal ischemic model // Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2011. Vol. 4. P. 496-504.

Научное издание

Коллектив авторов

НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ:
от генома до целостного организма

Под редакцией академика РАН М.В. Угрюмова
В 2-х томах
ТОМ 2

ООО «Издательство «Научный мир»
127055, Москва, Тихвинский пер., д. 10/12, корп. 4, офис 91
Тел. +7(499) 973-25-13, +7(499) 973-26-70
E-mail: naumir@naumir.ru. Internet: http://www.naumir.ru

Подписано к печати 29.12.2014
Формат 70×100/16
Гарнитура Times New Roman. Печать офсетная. Усл. печ. л. 68,37
Доп. тираж 300 экз. Заказ 1021-а
Издание отпечатано в типографии ООО «Галлея-Принт»
111024, Москва, ул. 5-я Кабельная, 2-б