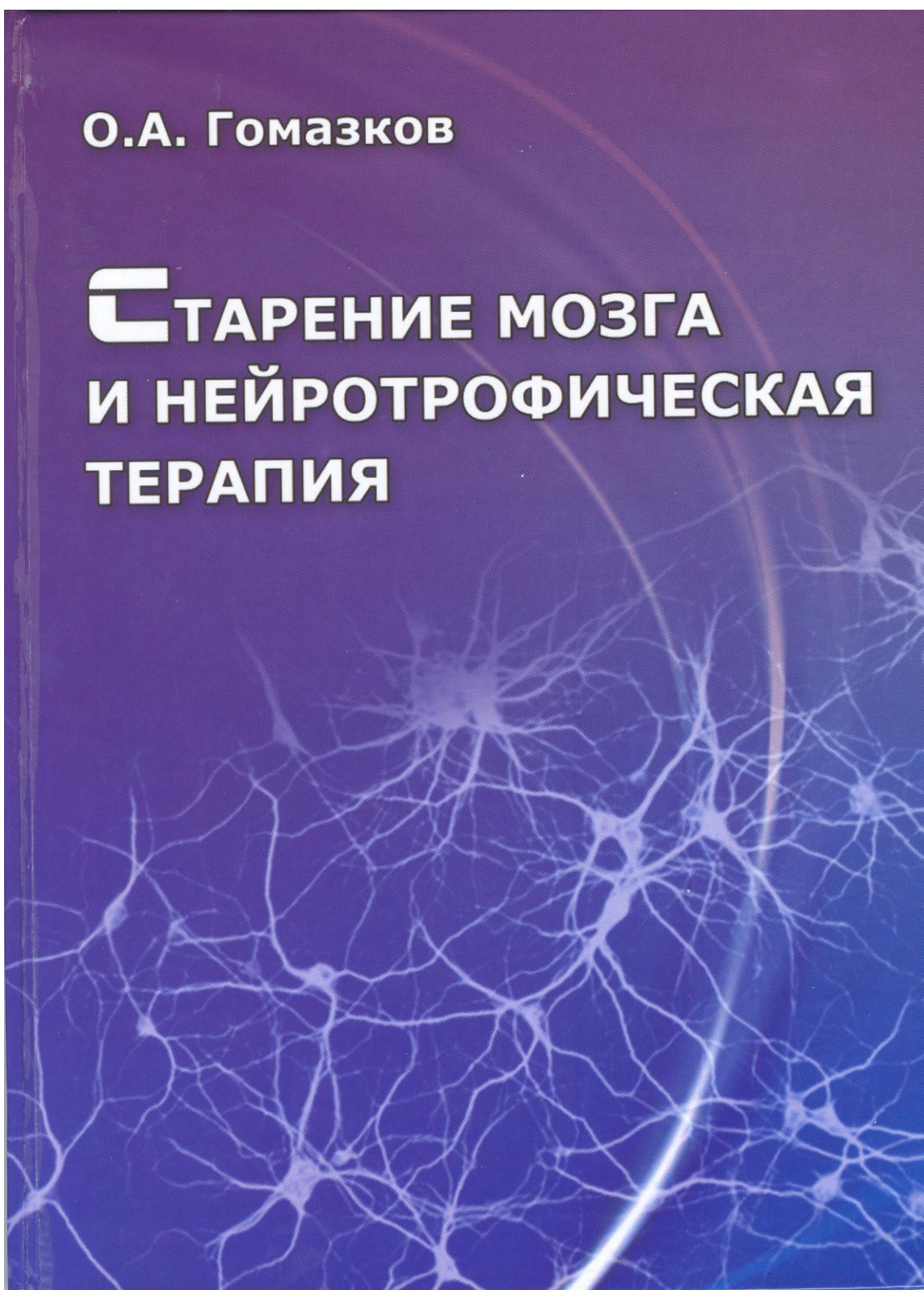


О.А. Гомазков

СТАРЕНИЕ МОЗГА И НЕЙРОТРОФИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ





ГОМАЗКОВ О.А.

СТАРЕНИЕ МОЗГА И НЕЙРОТРОФИНЫ.

Клеточные и молекулярные принципы нейротрофической терапии

М.: Издательство ИКАР, 2011.

Книга профессора О.А.Гомазкова, известного специалиста в области биохимии и физиологии нейропептидов и ростовых нейротрофических факторов, суммирует информацию о клеточных и молекулярных механизмах старения. Рассматривается роль окислительного стресса, апоптоза и аутофагии как исходных причин формирования возрастных изменений и нейродеструктивных заболеваний. Эти проблемы анализируются в связи с уникальной ролью нейротрофинов, которые обеспечивают регуляторную и защитную функции мозга в условиях нормы, приспособительных процессов и при патологии. Подчеркивается связь нейрогенеза (трансформации нейральных стволовых клеток) и нейротрофинов и в организации пластичности мозга и его защите. Впервые представлена информация о «минипептидах», структурных аналогах нейротрофинов, как новой формы терапии возрастных и нейродеструктивных заболеваний. Современная концепция предупреждения старения с использованием «минипептидов» предусматривает использование веществ, модулирующих активность эндогенных нейротрофинов. Книга полезна для широкого круга специалистов – медиков и биологов, научных работников и практических врачей, студентов, аспирантов, ординаторов различного профиля.

©О.А.Гомазков, 2011

СТАРЕНИЕ МОЗГА И НЕЙРОТРОФИНЫ

Клеточные и молекулярные принципы нейротрофической терапии

1. Биологические и социальные аспекты старения

- *Морфо-физиологические компоненты старения мозга.*
- *Базовые молекулярные компоненты функции возрастного мозга.*
- *Нейрогенез. Трансформация нейральных стволовых клеток в возрастном мозге.*

2. Молекулярные и клеточные механизмы старения.

- *Окислительный стресс, нарушение функции митохондрий – исходный патохимический инцидент. Возрастная динамика накопления митохондриальных дисфункций – предтеча возрастных заболеваний.*
- *Окислительный стресс запускает программируемую смерть клеток. Каскадная система апоптоза и деструкция ДНК – начало возрастной патологии мозга.*
- *Избирательная уязвимость нейронов при окислительном стрессе. Селективность «химизма» нейрона.*
- *Повреждение и репарация ДНК в нейронах. Региональная вариабельность деструкции ДНК в возрастном мозге. Концепция «меньше нейронов было бы лучше...». Возрастные изменения делают клетки мозга уязвимыми к патологии.*

3. Патология возрастного мозга. Молекулярные и клеточные механизмы.

- *Ишемическая патология. Инсульт в молодом и старом мозге.*
- *Нейродегенеративная патология. Болезнь Альцгеймера. Болезнь Паркинсона. Общие принципы начала заболевания и селективное поражение регионов мозга.*
- *Аутофагия – биологический феномен «двуликого Януса». Функция «мусорщика» или провокатора нарушений клеточного гомеостаза.*
- *Промежуточные итоги: молекулярные системы программы старения и нейродегенерации: промотирующие и защитные звенья.*

4. Нейротрофины. Факторы плеiotропной регуляции функций.

- *Нейротрофины. История открытия. Химическая структура и основные функции.*
- *Нейротрофины. Спектр функций, организующих работу мозга.*
- *Нейротрофины. Участие в ишемических и нейродегенеративных заболеваниях мозга. Возрастной аспект.*
- *Нейротрофины как регуляторный компонент программы старения.*

5. Нейропептиды

- *Нейропептиды. Исходные представления.*
- *Нейропептиды и ишемическая патология мозга.*
- *Калликреин-кининовая система*
- *Ангиотензин II как детерминанта старения (Отголоски митохондриальной теории).*
- *Нейропептиды и нейродегенеративная патология мозга*
- *Нейропептиды и нейротрофины: общее и различное в регуляции протективных механизмов.*

6. Минипептиды и концепция нейротрофической терапии

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

1. Биологические и социальные аспекты старения

- Морфо-физиологические компоненты старения мозга.
- Базовые молекулярные компоненты функции возрастного мозга.
- Нейрогенез. Трансформация нейральных стволовых клеток в возрастном мозге.

Биологическое старение представляет одно из фундаментальных явлений жизни, которые объединяют здоровье, болезнь, социально-экономический статус, наконец, смерть индивидуума.

Одна из наиболее распространенных точек зрения предполагает, что скорость биологического старения определяется накоплением в организме клеточных и органных повреждений, и эти процессы зависят как от генетических факторов, так и от факторов окружающей среды. Немецкий ученый Август Вейсман (1834-1914), который одним из первых пытался внести научное определение проблемы, утверждал: «Я полагаю, что жизнь имеет фиксированную продолжительность не потому, что по своей природе не может быть неограниченной, а потому что неограниченное существование индивидуумов было бы роскошью без какой-либо проистекающей из нее выгоды. Изношенные индивидуумы не только бесполезны для вида, но даже вредны, поскольку они занимают место тех, кто здоров». Пытаясь научно обосновать эту точку зрения, А.Вейсман рассматривал старение как побочный продукт реализации программы индивидуального развития. [*A.Weismann/Essays upon heredity and kindred biological problem.1871. Claderon Press. Oxford*]

Эта социально-философская концепция долгое время рассматривалась как противоречащая основам теории Дарвина, как концепция антигуманистическая, и её автор подвергался обструкции во многих странах мира.

Последовательно выдвигавшиеся в 50-70-х годах прошлого столетия биологические теории отражали достижения биохимии и молекулярной биологии того периода. В качестве исходных причин рассматривались: окислительный стресс и образование свободных радикалов в организме (Н.М.Эммануэль, 1954); нейрогуморальная дисрегуляция и нарушения метаболизма клеточных белков (В.М.Дильман, 1957); теломеразная концепция, которая во главу ставила процессинговый дефект молекулы ДНК (А.М.Оловников, 1971); реализация генетической программы самоуничтожения, постепенно разрушающей организм (В.П.Скулачев, 1999).

Как показывает анализ данных в базе Pubmed, число публикаций за последние 10 лет по запросу "aging patient" превысило 18 тысяч; из них около 10 тыс. посвящены вопросам терапии возрастных больных и около 600 рассматривают теоретические аспекты пожилого пациента.

Современное понятие генома постулирует персональную доминанту присутствия в генотипе единиц, предопределяющих возможность развития того или иного заболевания, и генов, обуславливающих реакцию на лечение (*Jeste DV, Depp CA. Positive mental aging. Amer J Geriatr Psychiatr. 2010;18(1):1-30*). Одна из последних теорий – геномная концепция – определяет старение как «медленное угасание транскрипционной активности генома», связанное с отдельными генами, набор которых в разных тканях может сильно варьировать. Идентифицируются условно обозначаемые «гены долгожительства» и «гены-регуляторы старения»: они определяют «мозаичность» возрастных изменений тканей организма, и потому ослабление транскрипционной активности генома ведет к постепенной

«порче» всего генома человека (**Баранов В.С., Баранова Е.В. Генетические аспекты старения. Успехи геронтологии 2007, том 20, №2, стр.26-34**). В рамках этой концепции следует детализировать два обстоятельства:

(1) Функционально значимые белки, представляемые как «гены долгожительства» - bcl-2, APO-E, интерферон- γ , ингибитор активатора плазминогена (PAI-1), интерлейкин-10, фактор некроза опухоли- α (TNF- α) и другие, действительно, являются важными регуляторными элементами многих функций организма, однако «порча» их есть на поверку *следствие реализации процесса старения*, запущенного другими молекулярными причинами.

(2) Концепция тканевой (органной) «мозаичности» предполагает неодинаковую уязвимость клеточных систем, определяющих устойчивость организма к предъявляемым обстоятельствам. Следует полагать, что основой такой мозаичности служат причины генного порядка, которые влияют в конечном счете на функциональный дисбаланс, инверсии клеточных циклов или трансформацию прогениторных (стволовых) клеток и т.п., о чем речь пойдет в последующих разделах.

Старение представляет собой неизбежный процесс аккумуляции негативных изменений в клетках, которые снижают способность выживания. Возрастные изменения являются результатом суммации генетических факторов, влияния окружающей среды и заболеваний, переносимых в течение жизни. Старение характеризуется накоплением материала «изношенных» клеточных и субклеточных структур (органелл), которые снижают эффективность биологических процессов, необходимых для поддержания гомеостаза и адаптивного выживания в предлагаемых обстоятельствах. Нарушение биологических процессов в клетках и организме в целом обусловлено снижением активности репаративных механизмов, которые ликвидируют возникающие клеточные повреждения при старении.

Точные механизмы старения остаются не понятыми в полной мере, хотя многие элементы повреждения выявлены достаточно доказательно. Очевидно, что такие долгоживущие клеточные системы, как кардиомиоциты и нейроны, не могли бы эффективно работать в течение срока жизни, если бы в них не существовали мощные биохимические и морфологические системы ликвидации поврежденных клеточных структур. Старение клеток характеризуется прогрессирующим накоплением нефункциональных клеточных компонентов. Накопление «дефектных» субклеточных частиц (митохондрий, фрагментов ядра, мембран, «испорченных» белков и др.) играет существенную роль в развитии старения. Удаление этого материала лизосомальными ферментами за счет аутофагии оказывается формой защиты (сдерживания) от старения. (**Rajawat YS, Bossis I. Autophagy in aging and in neurodegenerative disorders. Hormones (Athens) 2008;7(1):46-61**).

Таким образом, исходно принято считать, что существуют две точки зрения на старение. Первая: старение – результат накопления *случайных поломок* в сложной системе, каковой является живой организм. Вторая: старение – заключительный этап индивидуального развития организма, запрограммированный в геноме. В.П.Скулачев делает принципиальное дополнение к этой позиции: в противовес распространенному мнению о старении как процессе накапливающихся повреждений, постулируется существование единой причины, запрограммированной в геноме: *«Мы исходим из того, что старение – это запрограммированный (ПРИРОДОЙ – ОА) предопределенный процесс, катализатором которого является кислород»* (**Скулачев В.П. Феноптоз: запрограммированная смерть организма, Биохимия 1999, том 64, №12, стр.1679-1688**).

Исследованиями последних десятилетий было установлено, что в любой клетке существует специальная геномная программа биохимического самоубийства, когда включается каскад процессов, приводящих к смерти клетки. В 2002 году Сидней Бреннер, Роберт Хорвиц, Джон Э.Салстон получили Нобелевскую премию за открытие генов, отвечающих за апоптоз. Объектом исследования служил маленький червячок *Caenorhabditis elegans*, в геноме которого были выявлены особые гены самоубийства определенных клеток. Так было установлено, что апоптоз (специализированный биохимический механизм уничтожения клеток) – есть целенаправленная генетическая программа, а не просто результат «распоясавшегося» кислородного метаболизма митохондрий. В.П.Скулачев считает, что согласно такой позиции эволюционное упрочение вида состоит не только в устранении биологически «нецелесообразных» особей, но и в прогрессивном отборе признаков, нужных для устойчивого существования популяции в данных условиях среды.

По-видимому, для современного человеческого сообщества, мучительно приспособляющегося к условиям создаваемой им среды обитания, и в условиях цивилизационного насыщения средствами как сохранения, так и разрушения здоровья, такая концепция представляется интересной и требующей разнотипных подходов к воздействию на качество и продолжительность жизни человека.

1.1. Морфо-физиологические компоненты старения мозга

Основы современной неврологии были заложены многими выдающимися учеными XIX-XX веков. Среди них особо стоит имя Сантьяго Рамон-и-Кахаля (1852-1934), гистолога, педанта, романтика. Изучая структуры нервных клеток, он открыл многие важные закономерности, предсказал феномен апоптоза и предложил «нейротрофическую гипотезу» роста и ветвления нейронов (РИС.1)

Структура мозга меняется в течение всей жизни. Онтогенетические исследования, проведенные с помощью магниторезонансной томографии, показывают, что объем мозга и его вентрикулярная система постепенно редуцируются. Потеря веса мозга в диапазоне от 60 до 90 лет выражается 35%-ной редукцией гиппокампа, 15%-ной – коры мозга и 25%-ной – белого вещества. Однако отдельные паттерны этих изменений достаточно гетерогенны даже в здоровом мозге и затрагивают, в первую очередь, переднюю и теменную кору, thalamus, putamen и nucleus accumbens. Толщина кортикального слоя и субкортикальный объем могут меняться в течение одного года на 0,5-1,0%. Эти изменения сопровождаются редукцией синаптических узлов и уменьшением нейрональных контактов. До 50% уменьшается протяженность миелинизированных аксонов (*Fjell AM, Walhovd KB, Structural brain changes in aging: courses, causes and cognitive consequences. Rev Neurosci. 2010;21(3):187-221*).

В «возрастном мозге» выявляются существенные изменения васкулярной системы. На макроскопическом уровне отмечается редукция плотности сети микрососудов, ведущая к снижению микроциркуляторного кровотока и кислородного обеспечения ткани. На клеточном уровне изменения в сосудистой стенке (её утоньшение) сопровождаются сниженной экспрессией рецепторов нейротрофических и ростовых факторов, регуляторов роста и выживания клеточных систем. Потеря части миоцитов и уменьшение диаметра сосудов и связанное с тем снижение способности поддерживать напряжение внутрисосудистого давления влечет ухудшение кислородной оксигенации. Возрастные изменения церебральной кровеносной системы обуславливают пониженную активность

циркулирующих ростовых факторов, что ведет к сужению функционирующих сосудов. Все эти изменения не могут не отразиться на рабочем потенциале мозга и сопряжены с его повышенной уязвимостью к ишемическим и нейродегенеративным влияниям.



С другой стороны, глиальные клетки в возрастном мозге, вероятно, проявляют тенденцию к увеличению, которая ассоциируется с более выраженной иммунореактивностью астроцитов и микроглиальных маркеров. Эти изменения могут интерпретироваться как возрастные проявления нейронального воспаления; по крайней мере, как корреляция очевидной активации микроглии и нейродегенерации. Таким образом, микроглия в возрастном мозге сама по себе оказывается субъектом клеточного старения (*Conde JR, Streit WJ. Microglia in the aging brain. J Neuropathol Exp Neurol. 2006;65(3):199-203*). Такие изменения определяют функциональный статус возрастного мозга, что выражается в ухудшенном контроле скорости протекания реакций, реализации исполнительных процессов, уровней когнитивных функций, общего адаптивного потенциала. Возрастные изменения характеризуются прогрессирующим расстройством взаимосвязанных функций, включающих ощущение, память, распознавание, моторный контроль, эмоциональность.

Одним из самых значительных признаков старения является снижение пластичности мозга, как интегративной функции, связующей соматическую, ментальную и социальную сферы жизнедеятельности. Современная нейрофизиология рассматривает в качестве основных признаков нарушения пластичности, связанных со старением, ограничение программы активности мозга, неадекватные проявления функции, ослабленный

нейромодулирующий контроль и нереализуемость функции обратной связи. Комплекс возрастных изменений включает нарушение восприятия, памяти, познавательных (когнитивных) навыков, моторного контроля, эмоциональной реактивности. В качестве базового компонента, влияющего на качество жизни, принимаются расстройства когнитивной функции. Всемирная Психотерапевтическая Лига предложила специальную диагностическую позицию для градации легких, по преимуществу «здоровых» возрастных нарушений ментальных функции у пожилых людей. Большинство таких пациентов с заметной дисфункцией соответствует границам возрастной нормы, однако под влиянием стрессорных или аффективных нарушений когнитивный дефект углубляется, достигая уровня «умеренно когнитивных расстройств».

М. Penner и соавторы (2010) представили «эпигенетическую гипотезу» изменений когнитивных процессов стареющего мозга. Современная интерпретация этого принципа предполагает ковалентные модификации ДНК и посттрансляционные изменения ядерных белков, которые ведут к необратимым переменам в структуре хроматина. Ассоциируемое с возрастом ухудшение памяти относится к дезинтеграции функций, анатомически связанных с гиппокампом и префронтальной корой мозга. Нейробиологическое обоснование связанного с возрастом дефицита памяти включает aberrantные (т.е. «сбившиеся с правильного пути») изменения в транскрипции генов, которые непреложно влияют на изменение пластичности стареющего мозга (**Penner MS, Roth TL, Barnes C, Sweatt JD. An epigenic Hypothesis of Aging-Related Cognitive Dysfunction. Front Aging Neurosci. 2010;2:9-11**).

Согласно Mahncke и соавт. (2006) возрастные изменения мозга характеризуют четыре ключевые фактора: (а) ограничение признаков физиологической активности; (б) помехи в выполнении функции ("noisy processing"); (в) ослабленный нейромодуляторный контроль; (г) затрудненное обучение. Все они складываются в спонтанную спираль деградации функций. В итоге эти позиции определяют расстройство адаптивной пластичности мозга, обусловленные изменениями образа жизни, поведения, статуса индивидуума и/или инверсией «биохимической механики» мозга (**Mahncke HW, Bronstone A, Merzenich MM. Brain plasticity and functional losses in the aged: scientific bases for a novel intervention. Prog Brain Res. 2006;157:81-109**).

Развиваемая в последние годы теория «подпорки» (scaffolding theory) когнитивной функции возрастного мозга предполагает, что наблюдаемые изменения отражают как снижение нейрональных функций, так и компенсаторную их перестройку. В самом деле, как демонстрируют морфологические исследования, «возрастной» мозг обнаруживает уменьшение кортикального слоя, интегративного белого вещества, снижение дофаминергической активности и функциональный дисбаланс в сенсомоторном регионе, гиппокампе и затылочной зоне. В то же время, отмечается компенсаторное увеличение активности структур переднего мозга, которые коррелируют с поведенческим статусом возрастного индивидуума (**Goh JO, Park DC. Neuroplasticity and cognitive aging: the scaffolding theory of aging and cognition. Restor Neurol Neurosci. 2009;27(5):391-403**).

Как показывают специальные исследования, в условиях «обогащенной окружающей среды» (говоря бытовым языком, «лучших условий жизнеобитания» - пищи, пространства, отсутствия агрессивных факторов, стимуляции позитивных эмоций и т.п.) происходит сохранение и улучшение синаптического взаимодействия в регионах мозга. Эти явления сопровождаются активацией синтеза медиаторов и сбалансированного соотношения глутамата и ГАМК в гиппокампе, а также дофамина и ацетилхолина в префронтальной коре в условиях «мягкого» стресса (**Mora F, Segovia G, del Arco A. Aging, plasticity and environmental enrichment: structural changes and neurotransmitter dynamics in several areas of the brain. Brain Res Rev. 2007;55(1):78-88**).

1.2. Базовые молекулярные компоненты функции возрастного мозга

Функция нейрональной пластичности обеспечивается системой сигнальных биохимических конструкций, где одну из центральных ролей играют протеинкиназы. Им принадлежит «стратегическая» функция превращения клеточного сигнала в физиологический ответ. Современные воззрения представляют, что формирование возрастной дисфункции мозга связано с изменениями активности и порядка включения сопряженных звеньев *внутриклеточной сигнализации*.

Удивляющее разнообразие регуляторных возможностей, связанных с активностью нейротрофинов и нейропептидов, гормонов и других компонентов экстра- и внутриклеточной регуляции, находит свое частичное объяснение в понимании сложной картины сигнальной трансдукторной системы. Рассмотрение её включает по меньшей мере три основных «этажа» биохимических процессов: (а) соединение лиганда (нейротрофина, пептида, гормона и др.) с соответствующим рецептором; (б) активация многосложной, разветвленной системы функциональных белков – в соответствии со специфичностью «лигандного сигнала»; (в) внутриклеточная – на уровне мембран и органелл клетки, экспрессия роста, дифференцировки, апоптоза, нейрогенеза, синтеза новых белков и других продуктов и множества биохимических процессов, составляющих динамичную мозаику жизнедеятельности клетки. Функции мозга в условиях нормы, патологии, старения определяются содержанием этих процессов. Конкретное представление определенных звеньев сигнальной трансдукторной системы и возможности корректирующего воздействия представляют новое направление современной медицины – «сигнальной трансдукторной терапии» (signal transductional therapia). Подробнее см. раздел 6.

Полное представление перечня нейробиологических субстратов, связанных с проявлениями возрастного дефицита памяти, едва ли возможно, но, по меньшей мере, следует отметить, что процессы памяти и синаптической пластичности в «когнитивно здоровом» мозге возрастных индивидуумов сопряжены с транскрипцией генов раннего ответа, которые включают *Arc* ("activity-regulated cytoskeletal gene"), *zif268* (известный как фактор роста нервов, NGF) и *bdnf* (нейротрофический фактор мозга). В экспериментальных исследованиях было установлено, что блокада экспрессии этих генов у взрослых животных предотвращает процесс консолидации памяти. Сниженная экспрессия ранних генов отмечается в некоторых моделях искусственного нарушения памяти или в процессе нормального старения.

Особая роль принадлежит процессам, связанным с активностью нейронального Ca^{2+} . Изменения уровня внутриклеточного Ca^{++} вызывают каскад событий, влияющих на локальные и генерализованные процессы в нейрональной сети. Величина и длительность диффузии внутриклеточного кальция оказываются регулятором синаптической пластичности – модуляции нейротрансмиттерной передачи, долговременной потенциации электрического сигнала в нейроне, роста и ветвления дендритов. Дизрегуляция механизма активности нейрона и нарушение гомеостаза «кальциевого насоса» связывается с ослаблением функций возрастного мозга. Идея о том, что возрастные нарушения когнитивных процессов ассоциируются с расстройством кальциевого гомеостаза (**Foster E. Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. *Aging Cell.* 2007; 7:319-25**), подкрепляется многими фактами. Большинство таких исследований сфокусированы на гиппокампе, структуре, первично связываемой с изменениями памяти. Известно, что Ca^{++} -зависимые процессы, такие, как реакция на медиаторную гиперстимуляцию, индукция синаптической пластичности, депрессия интранейронального электрического сигнала, существенно меняются с возрастом. Образно говоря, физиологическое старение оказывается следствием «расползающейся» ассоциации клеток, которая связывается с дисфункцией кальциевого

гомеостаза. Изменения уровня нейронального Ca^{++} могут служить маркером, который отражает начало окислительного стресса. Таким образом, понижение жизненного статуса или повреждение мозга сопрягается с дисрегуляцией нейронального Ca^{++} и непреложно приводит к развитию нейродегенеративной патологии. В целом, изменения нейрональной активности, характеризующие клеточную возбудимость и синаптическую пластичность, ассоциируются с расстройством когнитивной функции и снижением памяти индивидуума.

1.3. Нейрогенез. Трансформация нейральных стволовых клеток в возрастном мозге.

Нейрогенез, т.е. образование новых клеточных структур (нейронов, олигодендроцитов, астроцитов) в результате трансформации эндогенных стволовых клеток происходит в течение всей жизни. Этот процесс служит основой обеспечения пластической функции мозга и регулируется многими факторами. Экспрессивное образование новых нейрональных структур происходит в процессе онтогенеза, увеличенной физической активности, гипоксии, стрессе, обучении, пребывании в благоприятной «обогащенной среде». Экспрессия нейрогенеза наблюдается также при ишемии мозга, травме, начальных стадиях нейродегенеративной патологии.



Нейрогенез во взрослом мозге проходит основные фазы: (1) асимметричное деление нейральных стволовых клеток с различной функцией дочерних клеток; (2) пролиферация (размножение) образующихся новых клеток; (3) выживание определенной пропорции клеток из «избыточной» массы; (г) дифференцировка клеток в определенный фенотип

(нейрон, астроцит, олигодендроцит); (д) миграция зрелых клеток преимущественно в зубчатое ядро гиппокампа и субвентрикулярную зону. Большинство исследований, связанных с нейрогенезом, базируется на использовании клеточных маркеров тимидиновых аналогов (BrdU) или выявлении экспрессии маркеров пролиферации и зрелых клеток: даблкортин и бета-тубулин, белки, ассоциированные с микротрубочками, возникающие в дифференцирующихся пронеуронах; винментин, который синтезируется в несформировавшейся глии; кислый глиальный белок GRAF; Neu-N - определяемый в ядрах зрелых клеток и др. **(РИС.2)**.

Гисто-физиологическими исследованиями было установлено, что новообразующиеся нейроны могут быть вовлечены в функцию гиппокампа, в первую очередь, в зубчатой извилине. Эти явления ассоциируются с активностью гиппокампа в организации процессов обучения, памяти и эмоционального поведения. Была продемонстрирована связь между скоростью нейрогенеза и эмоциональным статусом (*Sahay A, Hen R. Hippocampal neurogenesis and depression. Novartis Found. Symp. 2008;289:152–160*). Выявляется взаимосвязь нейрогенеза во взрослом гиппокампе с процессами обучения и памяти. Внутривенная инъекция культуры нейрональных прогениторов приводила к улучшению памяти и когнитивных признаков у крыс, подвергнутых ишемии мозга. Нейральные стволовые клетки обнаруживались в ипсилатеральном полушарии; выявлена экспрессия нейротрофического фактора BDNF на 28-е сутки эксперимента (*Mochizuki N, Moriyama Y, Takagi N, et al./ Intravenous injection of neural progenitor cells improves cerebral ischemia-induced learning dysfunction. Biol Pharm Bull. 2011;34(2):260-5*). Неинвазивными исследованиями был осуществлен мониторинг нейрогенеза у человека. В сочетании с опросным психофизиологическим тестированием эта технология позволяет непосредственно судить о роли нейрогенеза в конструкции когнитивных процессов, их нарушений при патологии и возможности терапевтической коррекции (*Manganas LN, et al. Magnetic resonance spectroscopy identifies neural progenitor cells in the live human brain. Science. 2007;318:980–985*).

Серии новых исследований тесно связывают нейрогенез и поддержание процессов памяти и обучения. На уникальном материале из образцов ткани гиппокампа, получаемых при хирургическом вмешательстве у больных эпилепсией (23 человека), было установлено, что низкий уровень пролиферации и дифференцировки стволовых клеток образцов коррелировал с нарушениями памяти у пациентов. У пациентов с высокой пролиферативной потенцией нейральных стволовых клеток уровень когнитивной функции, тестируемой до операции, соответствовал норме (*Coras R, Siebzehnrubl FA, Pauli E, et al. Low proliferation and differentiation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans. Brain. 2010;133(11):3359-72*).

Возрастные процессы в мозге сопровождаются снижением нейрогенеза, которое констатируется: (1) уменьшением числа нейрональных предшественников, (2) снижением их пролиферативной активности, (3) удлинением клеточного цикла трансформации, (4) снижением пропорции выживших клеток к общему числу в течение первой недели созревания зрелых структур, (5) дифференцировкой клеток преимущественно в сторону глиального фенотипа. Более того, считается, что связанные с «угасающей» пластичностью нейронов гиппокампа изменения оказываются предтечей развития нейродегенеративной патологии. С возрастом снижается активность факторов, составляющих физиологическое содержание нейропластичности. Эти компоненты включают регрессию роста и ветвления дендритов, ремоделирования синаптических контактов и нейрогенеза. Снижение уровня нейрогенеза, затрагивающего преимущественно субвентрикулярную зону мозга и зубчатую извилину, выражается в ограничении пролиферации и удлинении клеточного цикла. В возрастном мозге нейрогенез может быть реактивирован соответствующими сигналами, исходящими из среды, что подтверждает догадку о том, что связанное со старением

ограничение нейрогенеза не является необратимым внутриклеточным процессом. Следовательно, здесь открывается возможность влияния на деменциальные возрастные потери функций с помощью соответствующих воздействий на реэкспрессию нейрогенеза (*Drapeau E, Nora Abrous D. Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. Aging Cell 2008;7(4):569-89*).

Установлено, что вновь образующиеся нейроны на различных стадиях своего становления вносят неодинаковый вклад в процессы памяти и обучения. В частности, как показывают компьютерные расчеты, в период, предшествующий полному созреванию, стволовые клетки гиппокампа выполняют роль интеграторов памяти и обучения, способных «кодировать события, происходящие в период, близкий во времени» (*Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? Nat Rev Neurosci.2010;11(5):339-50*). Снижение нейрогенеза в стареющем мозге сопровождается уменьшением числа предшественников и/или изменениями их митотической активности. Оба эти процесса приводят к гибели новообразующихся клеток еще до того, как они дифференцируются в гранулярные нейроны или клетки других фенотипов. Важным элементом, ограничивающим нейрогенез в стареющем мозге, является также недостаточное влияние ростовых и нейротрофических факторов, уровень которых (как и активация тирозинкиназных рецепторов) существенно снижаются (Более подробно см. раздел 4.3.).

СХЕМА 1. НЕЙРАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ ЭКСПРЕССИРУЮТ АКТИВНОСТЬ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ МОЛЕКУЛ

STEM CELLS AS "MICROPUMPS"

- | | |
|--|--|
| • ИММУНОМОДУЛЯТОРЫ | (антивоспалительные ХЕМОКИНЫ, Т-ЛИМФОЦИТЫ) |
| • СТИМУЛЯТОРЫ АНГИОГЕНЕЗА | (VEGF, PDGF, TGF- β , FGF-2) |
| • СТИМУЛЯТОРЫ НЕЙРОНАЛЬНОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ: рост аксонов и дендритов | (BGNF, MAPK-PI/Akt белки, тромбоспондины) |
| • ЭНДОГЕННЫЙ НЕЙРОГЕНЕЗ: трансформация НСК; снижение числа апоптирующих клеток | (FGF-2, basic FGF, IGF-I, GDNF) |

Таким образом, большинство исследований констатирует экспрессию нейрогенеза в гиппокампе с потенцированием процессов памяти и обучения. Дефицит когнитивной функции ассоциируется со структурными изменениями в гиппокампе. Старение, ограниченный нейрогенез и возрастная деменция определенно ассоциируются с гиппокампом, как основной структурой организации памяти и обучения в процессе жизнедеятельности.

Экспрессия нейрогенеза отмечена при ряде патологических состояний, которые существенно влияют на сбалансированные функции мозга и, следовательно, нуждаются в «пластической коррекции». Однако новые данные позволяют уточнить этот взгляд, поскольку сами стволовые клетки оказываются причастными к высвобождению и активации физиологически активных факторов, регуляторов выживания и нейрональной пластичности. Анализ этих данных, приводимых в работе *R.Guzman (Cellular stroke therapy: from cell replacement to trophic support. Expert Review of Cardiovascular Therapy. 2009;7(1):1187-1190)*, показан на схеме 1. Стволовые клетки выполняют роль своеобразных триггеров, инициирующих активность иммуномодуляторов и воспалительных цитокинов, регуляторов ангиогенеза, ростовых и нейротрофических факторов, а также сигнальных белков, экспрессирующих рост аксонов и их бранширование. В недавней публикации было также документировано, что стволовые клетки, получаемые из жировой ткани, стимулируют регенерацию периферических нервов за счет секреции BDNF этими клетками, способствуя росту аксонов de novo (*Lopatina T, Kalinina N, Karagyaour M, et al/Adipose-derived stem cells stimulate regeneration of peripheral nerves: BDNF secreted by these cells promotes nerve healing and axon growth de novo. PLoS One. 2011;6(3):e17899*).

При экспериментальной окклюзии средней артерии мозга крыс отмечается интенсивная пролиферация нейрональных стволовых клеток в субвентрикулярной зоне и их миграция в поврежденный регион мозга (*Arvidsson A, Collin T, Kirk D, et al. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. Nat Med, 2002, 8(9):963-970*). Была выявлена пролиферация нейрональных стволовых клеток; вновь образующиеся после инсульта клетки превращаются в зрелые нейроны в зонах гиппокампа и полосатого тела мозга (*Nakaomi H, Kuriu T, Okabe S. et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors, Cell, 2002,110(4):429-441*). Индукция нейрогенеза и пролиферация нейрональных предшественников были выявлены также у возрастных животных. Однако выраженность нейрогенеза после острой ишемии была у них заметно меньше, чем у контрольных молодых крыс.

Новый взгляд на проблему возрастной нейродегенеративной патологии предлагают *Lopez-Toledano MA* и соавторы (2010), формулируя свое исследование как «Нейрогенез в возрастном мозге: потенциальное средство для диагноза болезни Альцгеймера?» (*Lopez-Toledano MA, Ali Faghihi M, Patel NS/ Adult neurogenesis: a potential tool for early diagnosis in Alzheimer's disease? J Alzheimers Dis. 2010;20(2):395-408*). В этой работе показано, что обработка нейрональных стволовых клеток амилоидными A β -пептидами in vitro стимулирует нейрональную дифференцировку. На ювенильных трансгенных мышах, моделирующих болезнь Альцгеймера (БА), была подтверждена стимуляция нейрогенеза. Авторы считают это явление первичным признаком (маркером) развития БА уже на ранних стадиях. Сложность понимания этого моделирования - в ограниченности переноса экспериментальных построений на клиническую основу БА у человека.

Особо выделяется роль регулирующих нейрогенез влияний, в первую очередь, ростовых факторов. Установлено, что введение взрослым мышам в субвентрикулярную

зону эпидермального ростового фактора (EGF) стимулирует рост популяции нейрональных предшественников, дифференцирующихся в астроглиальный фенотип. У возрастных мышей (24-месячного срока) в субвентрикулярной зоне отмечается снижение на 50-70% активности рецепторов EGF и TGF- α (трансформирующего ростового фактора). Таким образом, редукция нейрогенеза связывается с пониженным влиянием этих факторов на трансформацию нейральных предшественников (**Enwere E, Shingo T, Gregg C, et al. Aging results in reduced epidermal growth factor receptor signaling, diminished olfactory neurogenesis, and deficits in fine olfactory discrimination. J. Neurosci. 2004;24,8354–8365**).

Более подробная информация получена для IGF-I (Инсулиноподобного ростового фактора). Во взрослом мозге IGF-I стимулирует пролиферацию и нейрональную дифференцировку в гиппокампе, однако при старении как сам IGF-I, так и его рецептор подвергаются депрессии, совпадающей со снижением нейрогенеза (**Lichtenwalner RJ, Forbes ME, Bennett SA, et al. Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. Neuroscienc 2001;107, 603–613**). Рецепторы фактора роста фибробластов (FGF-2), активно экспрессируются в астроцитах, находящихся в зубчатом ядре, субвентрикулярной зоне, ольфакторной плакоде (**Rai KS, Hattiangady B, Shetty AK. Enhanced production and dendritic growth of new dentate granule cells in the middle-aged hippocampus following intracerebroventricular FGF-2 infusions. Eur. J. Neurosci. 2007; 26, 1765–1779**).

Микрососуды мозга служат важным компонентом «ниши» нейрогенеза: сосудистая стенка служит проводником дистантно действующих паракринных регуляторов (гормонов, ростовых факторов и др.). В субвентрикулярной зоне и зубчатом ядре вновь образующие нейральные клетки группируются в тесной близости кровеносных сосудов, где отмечается высокая экспрессия эндотелиального ростового фактора (VEGF). Возрастные изменения в мозге характеризуются редукцией сети церебральных сосудов, а кроме того – понижением микроциркуляторной лабильности и уменьшенным синтезом VEGF (**Shetty AK, Hattiangady B, Shetty GA. Stem/Progenitor cell proliferation factors FGF-2, IGF-1, and VEGF exhibit early decline during the course of aging in the hippocampus: role of astrocytes. Glia 2005;51, 173–186**). В зубчатом ядре в возрастном мозге снижение числа капилляров достигает 25% в сравнении со зрелыми животными. Редуцированный ангиогенез, сниженный церебральный кровоток и совпадающее с ними уменьшение уровня VEGF составляют «триаду» возрастного нейрогенеза. Было установлено, что со старением увеличивается пространственная дистанция между эндотелиальными и стволовыми клетками, вследствие чего нарушается их функциональное единство. Таким образом, в организации этого единства важную роль играют доставляемые с кровью ростовые факторы (**Drapeau E, Nora Abrous D. Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. Aging Cell. 2008;7(4): 569-89**).

Падение уровня кортикостероидов, связанное с возрастом, оказывает существенное влияние на нейрогенез в гиппокампе. Снижение нейрогенеза зависит также от уменьшенного синтеза и релизинга медиаторов – глутамата и ГАМК, влияющих на трансформацию стволовых клеток в мозге. Речь идет, таким образом, о сложной системе факторов, оркеструющих синаптическую активность мозга и, соответственно, сопряженных с образованием новых клеточных структур материального обеспечения функции. С возрастом имеет место постепенное диссонирование налаженных отношений в этом исполнении. Что касается нейротрофинов, составляющих особую группу полипептидных регуляторов (BDNF, NGF, NT-3/4), им будет посвящена отдельная глава.

2. Молекулярные и клеточные механизмы старения

- Окислительный стресс, нарушение функции митохондрий – исходный патохимический инцидент. Возрастная динамика накопления митохондриальных дисфункций – предтеча возрастных заболеваний.
- Окислительный стресс запускает программируемую смерть клеток. Каскадная система апоптоза и деструкция ДНК – начало возрастной патологии мозга.
- Избирательная уязвимость нейронов при окислительном стрессе. Селективность «химизма» нейрона.
- Повреждение и репарация ДНК в нейронах. Региональная вариабельность деструкции ДНК в возрастном мозге. Концепция «меньше нейронов было бы лучше...». Возрастные изменения делают клетки мозга уязвимыми к патологии.

2.1. Окислительный стресс, нарушение функции митохондрий – исходный патохимический инцидент. Возрастная динамика накопления митохондриальных дисфункций – предтеча возрастных заболеваний.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ (оксидантный) СТРЕСС – процесс образования супероксидов – «активных форм кислорода», приводящих к активации апоптоза и разрушению клеточного содержимого, включая ДНК. Исходно окислительный стресс предназначен для выполнения естественной биологической функции – упорядочения клеточного пула. Нарушение баланса эндогенных про- или антиоксидантных систем в клетке приводит к митохондриальной дисфункции. Острый или длительно протекающий окислительный стресс служит причиной патохимических проявлений ишемического инсульта, нейродегенеративной патологии, травматических повреждений нервной системы, дисфункции сосудистого эндотелия и др. Возрастные дисфункциональные расстройства имеют в качестве одной из исходных причин нарушение структуры митохондрий и прогрессирование окислительного стресса.

Митохондрии представляют собой клеточные органеллы со множественными внутримембранными образованиями (кристами). Условно подсчитано, что общая площадь митохондрий всех клеток человека составляет 14000 кв. метров! Пересчитывая на бытовой образ, это – два с лишним футбольных поля Центрального стадиона в Лужниках, или 50 теннисных площадок Уимблдона! Природа упаковала на этой территории колоссальную биохимическую «кухню» – осуществляющую производство энергетических продуктов, необходимых для жизнедеятельности организма.

Уникальная функция митохондрий состоит в генерировании энергии, преимущественно в форме аденозинтрифосфата (АТФ); в митохондриях образуется более 90% этого продукта. Пируват и жирные кислоты транспортируются из цитозоля в митохондрии, подвергаясь превращениям в цикле трикарбоновых кислот. В отличие от других клеточных органелл, митохондрии имеют особый геном, структурно и функционально отличный от хромосомного ансамбля, присутствующего в ядре клетки.

Особенностью метаболизма мозга является интенсивный окислительный обмен. В нормальных условиях потребление кислорода тканью мозга составляет 3-4 мл\100 г в 1 мин. Уменьшение этой величины до 1.5 мл\100 г в 1 мин и ниже приводит к значительным

нарушениям нейронов. Ставится вопрос, насколько оправданы опасения, что повреждения тканей мозга при окислительном стрессе действительно имеют место? Совершенство методов клеточной физиологии позволило продемонстрировать существенное накопление свободных радикалов при окислительном стрессе. При ишемии обнаружено увеличение супероксид-аниона, гидроксид-радикала и пероксинитрита примерно в 10 раз. В нормальных условиях эти соединения обнаруживаются лишь в следовых количествах (А.А.Болдырев. Роль активных форм кислорода в жизнедеятельности нейрона. «Успехи физиол. наук» 2003;34(3):21-34).

Можно считать, что способность митохондрий продуцировать большие количества АТФ, ставит их в особое положение. Однако своеобразной расплатой за эту жизненно важную функцию оказывается образование высоко реактивных гидроперекисей, активных форм кислорода (АФК), токсичных для микроокружения. Каждая живая система снабжена антиоксидантной защитой, потому степень вредоносности окислительного стресса, зависит от соотношения про- и антиоксидантного потенциала системы.

Анатомические и функциональные особенности мозга делают его уязвимым к влиянию АФК. Эти молекулы резко увеличивают реактивность нейрональной ткани в отношении возбуждающих нейротрансмиттеров. АФК атакует глиальные клетки и нейроны; последние, будучи постмитотическими клетками, оказываются особенно уязвимыми к действию свободных радикалов. В то же время, окружающие глию эндотелиальные клетки создают своеобразный блок, поскольку они менее проницаемы для диффузии антиоксидантов.

РИС.3. УРОВЕНЬ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА ОПРЕДЕЛЯЕТ ГИБЕЛЬ, ВЫЖИВАНИЕ И ТРАНСФОРМАЦИЮ КЛЕТКИ



Биохимический механизм образования АФК представляется в настоящее время достаточно определенным. Исходной причиной запуска окислительного стресса оказывается то обстоятельство, что митохондриальный ферментативный комплекс NAD(P)H-оксидаза включает субъединицу цитохрома с, активация которой приводит к образованию супероксида $O_2^{\cdot-}$. Последний конвертируется супероксиддисмутазой в H_2O_2 или в комбинации с оксидом азота образует пероксинитрит ($OONO^{\cdot}$). H_2O_2 может взаимодействовать с липидами мембраны в присутствии металлов переменной валентности, то есть после образования гидроксид-радикала, образуя гидроперекиси (негативный путь окислительного стресса) или метаболизируется каталазой и глутатионпероксидазой (GSH-Px) в воду.

Современные данные вносят важные нюансы в понимание сущности и значения окислительного стресса. На **РИС. 3** показаны спектры молекулярных изменений в клетке в зависимости от количества образующихся АФК: при высоком уровне прооксидантных молекул имеет место инициация апоптоза с последующей гибелью клетки. Этому явлению предшествуют транскрипция белка p53, активация компонентов апоптоза PIGs, JNK, p38, каспаз и повреждение ДНК, РНК, белков, липидов. При «умеренном» образовании АФК отмечается включение других путей сигнальных молекул: NADPH, MAPK, PI3K/Akt и активация оксидаз – с последующей пролиферацией и ростом клеток, их миграции и т.д. На уровне минимального образования АФК реализуется, по-видимому, протективная функция, поскольку при экспрессии факторов транскрипции HIF, NF- κ B активируются антиоксидантные ферменты и стимулируется выживание клеток.

В 1956 году была предложена биохимическая гипотеза старения. Высказывалось предположение, что избыток свободных радикалов оказывается лимитирующей детерминантой продолжительности жизни (**Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol. 1956;11(3):298-300**). В сегодняшнем видении эта концепция обозначается как «свободно-радикальная-митохондриальная теория старения». В физиологических условиях только 1-2% O_2 превращается в супероксид, однако в «возрастном» мозге этот процент существенно увеличивается вследствие снижения пула антиоксидантных молекул. Возрастающая окислительная нагрузка в нейрональном микроокружении приводит к повышенному окислению липидов, белков и ДНК и образованию таких побочных продуктов метаболизма, как пероксиды, альдегиды, спирты, кетоны. Многие из них являются токсичными для макрофагов и лимфоцитов, парализуя активность защитных систем организма. По мере того, как с возрастом митохондрии подвергаются структурным изменениям, всё большая часть кислородных молекул конвертируется в АФК. Митохондрии возрастных организмов увеличиваются в размере, снижается скорость транспорта электронов, снижается их энергопродуктирующая функция. Эти явления служат основой для развития нейродегенеративных процессов. В статье с постановочным заголовком: «Биологические часы: митохондрии?», утверждается, что митохондрии, генерирующие избыток свободных радикалов, служат лимитирующим механизмом продолжительности жизни (**Harman D. The biologic clock: the mitochondria? J Am Geriatr Soc. 1972 ; 20(4):145-7**).

Современные концепции развития возрастной патологии рассматривают две основные (однако связанные по порочному циклу) причины митохондриальной дисфункции: (а) нарушение баланса про- и антиоксидантных систем, следствием чего является чрезмерное образование АФК и (б) мутации митохондриальной ДНК. Старение, как и развитие любой патологии мозга, провоцируется нарушением баланса про- и антиоксидантных систем в клетке. Антиоксидантные ферменты, так же как системы репарации ДНК и ядерных белков с возрастом или в условиях патогенеза подвержены

повреждению, что ведет к молекулярным и генным мутациям в структурах мозга. В соответствии с «митохондриальной теорией старения» прогрессирующая дисфункция митохондрий оказывается ведущей детерминантой процесса. Как показали последующие исследования, митохондрии возрастных животных отличаются изменениями структуры, ассоциируемыми с увеличенной продукцией супероксида и гидроперекисей. Соответственно, энергопроизводящая способность митохондрий резко уменьшается при повышенной «утечке» электронов из транспортной электронной цепи. Было установлено, что сверхэкспрессия каталазы в митохондриях ассоциируется с укороченной продолжительностью жизни мышей с ускоренным (см. обзор: **de Cavanagh F, Inseerra M, Ferder L, Ferder A. From Mitochondria to Disease: Role of the Renin-Angiotensin System. Am J Nephrol. 2007;27:545–553**).

Исследование функции эндотелия, общего структурного компонента васкулярной системы организма выявило существенные отличия у возрастных индивидуумов. В выборке испытуемых возраста от 18 до 91 года без признаков кардиоваскулярной патологии и существенных факторов риска были установлены различия в реакции на провоцирующие факторы окислительного стресса. На изолированных микрососудах мезентерия возрастных субъектов обнаружена повышенная генерация супероксидных анионов ($O(2)(-)$) и пероксинитрита ($ONOO(-)$) и экспрессия NADPH оксидазы и индуцибельной NO синтазы (**Rodríguez-Mañas L, El-Assar M, Vallejo S, et al./ Endothelial dysfunction in aged humans is related with oxidative stress and vascular inflammation. Aging Cell. 2009;8(3):226-38**). Поскольку дисфункция эндотелия и, как клинический показатель её, сниженная плетизмографическая реакция кровотока на введение ацетилхолина или брадикинина, служат предтечей множества заболеваний сосудистого генеза, установленная связь между прогрессированием окислительного стресса и дисфункцией эндотелиальных клеток является значимым возрастным фактором. Дисфункция эндотелия может, как известно, иметь как генерализованный, так и органно-тканевой характер. В таком случае возрастные заболевания могут иметь различный нозологический подтекст в соответствии с индивидуальной спецификой пациента.

Клетки мозга проявляют повышенную уязвимость к окислительному стрессу. Мозг человека нуждается в наибольшем потреблении кислорода, нежели любой другой орган. Особенности окислительного метаболизма в митохондриях, аккумуляция в нейрональной ткани ненасыщенных жирных кислот провоцируют высокую реактивность мембран в отношении перекисного окисления. К тому же, антиоксидантная система митохондрий оказывается значительно менее мощной, чем в других органеллах нейрона, вследствие чего митохондриальная ДНК в большей мере (в 10-100 раз) может быть подвергнута окислительному повреждению, чем ДНК ядерная. Митохондриальная недостаточность приводит к нарушению деликатного баланса внутриклеточного кальция в нейроне, и, в конечном счете, - к гибели клетки.

Следовательно, борьба со старением, забота о здоровом статусе возрастного организма определяется необходимостью усиления антиоксидантного потенциала. Суть такого подхода – предупреждение губительного действия окислительного стресса, защита ядерной ДНК, продление сбалансированного статуса физиолого-биохимических процессов в нервной ткани.

В работах В.П.Скулачева и сотрудников было установлено, что если построить кривые зависимости продолжительности жизни организма от количества свободных радикалов в митохондриях, то выясняется определенная закономерность: чем больше в клетке свободных радикалов, тем меньше мы живем. «Мы рассматриваем старение как

такой медленный феноптоз, который запускается довольно рано, причем именно с помощью внутримитохондриальных активных форм кислорода» - таково базовое положение концепции. Конкретным подходом к подтверждению этой концепции может быть создание мощного антиоксиданта особого свойства, направленно диффундирующего в митохондрии. Синтез и испытание такого вещества создает новые предпосылки для борьбы с признаками старения **(В.П.Скулачев. Попытка биохимиков атаковать проблему старения: «мегапроект» по проникающим ионам. Итоги и перспективы. «Биохимия». 2007;72(12):1700-14).**

2.2. Окислительный стресс запускает программируемую смерть клеток. Каскадная система апоптоза и деструкция ДНК – начало возрастной патологии мозга.

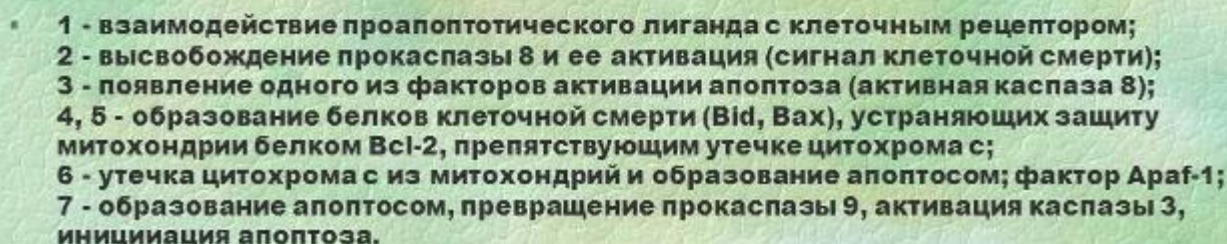
АПОПТОЗ - природный биологический процесс уничтожения определенных популяций «ненужных» клеток; регулируемый механизм упорядочения качественного состава клеточной популяции. Исходным механизмом запуска апоптического каскада служит нарушение окислительного метаболизма в митохондриях и образование токсических гидроперекисей (окислительный стресс). Каскадная биохимическая система апоптоза включает молекулярные «мишени», позволяющие влиять на фатальный характер процесса. Возрастные изменения и нейродегенеративные заболевания являются прямым следствием нарушения соотношения про- и антиапоптотических систем в клетке.

Внимательное чтение работ испанского нейробиолога С.Рамона Кахаля (Santiago Ramón y Cajal) позволяет предположить, что именно ему принадлежит догадка об апоптозе. В 1892 году он писал:

«... Я заметил, что каждая ветвь, дендритная или аксонная, в процессе развития проходит хаотическую стадию, или стадию проб, в течение которой она посылает наугад отростки, которым суждено исчезнуть. Позднее, когда прибывают афферентные нервные волокна или когда нейроны окончательно сформируются, то остаются только полезные отростки. В этом случае природа поступает как садовник, оставляющий здоровые и иссекающий больные побеги» (Р.С.Кахаль. Автобиография. Под ред. А.В.Смоляникова и Д.С.Саркисова. Медицина. М. 1985.Стр. 116-117).

Апоптоз, или программируемое уничтожение клеток, следует исходно рассматривать как нормальный биохимический механизм функционирования нервной ткани, способствующий упорядочению клеточного пула, поддержанию равновесия популяций клеток. Экспрессия апоптоза ассоциируется со старением, раком, аутоиммунной патологией и нейродегенеративными заболеваниями.

Окислительный стресс служит триггером для включения биохимического каскада апоптоза. Таким образом, апоптоз оказывается завершающей стадией дисфункции митохондрий, приводящей к программируемой смерти клеток. Окислительный стресс стимулирует высвобождение апоптоз-индуцирующего фактора (AIF), особого митохондриального белка, способствующего активации каспазы-9, и исходу цитохрома с из митохондрий, которые активируют каспазу-3 и другие цитозольные ферменты апоптоза. Проникающий в ядро AIF участвует в деструкции хроматина и фрагментации ДНК. Динамика апоптического процесса регулируется соотношением про- и анти- апоптотических белков семейств Bcl-2 и p53. Дефект энергопродуцирующей функции митохондрий и увеличенная продукция АФК способствуют открытию митохондриальных пор и инициируют каскад реакций апоптоза **(РИС.4).**



Конкретные данные связывают «механику» апоптоза с патогенезом нейродегенеративных заболеваний. В мозге пациентов болезни Альцгеймера обнаружена активация белка Вах, каспазы-3 и повышенная фрагментация ДНК. Более того, активация каспаз и расщепление каспазами белка амилоидного предшественника (APP) и tau-белка облегчает образование токсического β -амилоида ($A\beta$) и формирование нейрофибриллярных сплетений. Роль апоптоза в патологии Паркинсона также документируется увеличением числа нейронов с деструктурированной ДНК (TUNEL-позитивных клеток), аккумуляцией белка Вах и активированной каспазой-3 в нейронах меланизированной черной субстанции (pars compacta).

Общая схема митохондриальной дисфункции и промотирования апоптоза в нейродегенеративной патологии представлена на **РИС. 5**. Дисфункция митохондрий, связанная с нарушением окислительного обмена и возрастной динамикой [1], приводит к образованию больших количества АФК (активных форм кислорода, продуктов гидропероксидации), и включению каскадной системы апоптоза с деструкцией ядерной ДНК [2]. Образование АФК влечет одновременно активацию сигнальных молекул, запускающих по принципу «порочного круга» усиленную деструкцию митохондриальной



ДНК [3]. Эти процессы приводят к дисфункции нейронов и градуальному развитию патологических явлений в мозге [4].

2.3. Избирательная уязвимость нейронов при окислительном стрессе. Селективность «химизма» нейрона.

Отдельные популяции клеток мозга обнаруживают различную чувствительность к влиянию окислительного стресса. Ввиду селективной уязвимости определенные нейроны первыми реагируют нарушениями и ранее других подвержены программируемой смерти в период старения. Это обстоятельство становится значимым при анализе процессов старения и патогенеза нейродегенеративных и ишемических заболеваний мозга. Для более подробного рассмотрения, по-видимому, следует принять во внимание ряд соображений.

(а) Мозг представляет структуру, высоко гетерогенную как в морфологическом, так и биохимическом плане. Эта гетерогенность относится к наличию функционально

специализированных зон и отделов мозга, размерам нейронов, числу и ветвлению дендритов, комплексности синаптических контактов, насыщенности глиями клетками и т.д.

(б) Значительная часть нейронов имеет особую химическую специализацию; речь идет о холинергическом, ГАМК-эргическом, дофаминергическом, пептидергическом, глутаматергическом (и т.п.) типах медиаторной специализации, как способности синтезировать определенные нейротрансмиттеры и реагировать на них. Современная нейробиология допускает возможность образования нескольких медиаторов в пределах одной нейрональной структуры. Такая организация большого спектра функциональных назначений демонстрирует мозаику химических процессов, характерных как для отдельной нервной клетки, так и для мозга в целом. Каждая клеточная популяция имеет, по-видимому, уникальный профиль генной экспрессии в пределах единого генома, с включением нужных белков и других продуктов, определяющих особенности её «химизма». Таким образом, можно также говорить о селективности «химизма» нейрональных структур, существующего как в плане исходной организации клетки, так и как результат её изменений в процессе жизнедеятельности.

(в) Несмотря на то, что структура и функции различных зон мозга хорошо документированы, представления относительно реакции на стресс и другие факторы, сопутствующие старению, известны в меньшей степени. Например, нейроны энторинальной коры мозга, клеток CA1 гиппокампа, фронтальной коры и амигдалы оказываются более чувствительными к нейродегенерации, связанной с болезнью Альцгеймера. При болезни Паркинсона первично подверженными апоптозу оказываются нейроны черной субстанции. В условиях глобальной ишемии мозга или на ранней стадии болезни Альцгеймера клетки CA1 гиппокампа более уязвимы, чем нейроны зоны CA3 (*Olsson T, Wieloch T, Smith ML Brain damage in a mouse model of global cerebral ischemia. Effect of NMDA receptor blockade. Brain Res. 2003;982(2):260-9*).

(г) Следует принимать также во внимание структурное состояние церебральной гемодинамики, особенно значимой при ишемических, возрастных и дегенеративных процессах. Помимо особенностей морфологии микроциркуляторного русла, имеет значение распространенность в мелких артериолах атеросклеротических образований. Химическая регуляция миоцитов, клеток эндотелия и капиллярного ложа имеет свою специфику, существенно отличающуюся от регуляции нейрональных структур.

Транскрипционный анализ показывает, что уязвимость или, напротив, устойчивость к стрессу различных нейронов зависит от уровня продуцируемого клеткой АТФ, то-есть её энергетического резерва. Репарация повреждаемой апоптозом ДНК (об этом речь пойдет ниже) и защита от клеточной смерти выражены значительно меньше в нейронах с ограниченным энергетическим потенциалом.

2.4. Повреждение и репарация ДНК в нейронах. Региональная вариабельность деструкции ДНК в возрастном мозге. Концепция «меньше нейронов было бы лучше...».

В 1967 году была предложена теория старения, которая рассматривала в качестве исходной причины повреждение внутриклеточной ДНК. Накопление деструктивных изменений, т.е. изменения трехмерной структуры молекулы, ведут к прогрессирующей дисфункции систем, связанных с синтезом новых белков. Повреждение ДНК приводит к множественному расстройству сопряженных процессов – нарушению транскрипции, торможению репликации, инверсии клеточного цикла, мутагенезу, аутофагии клетки.

Последовательное накопление мутационных изменений (т.е. стойких и наследуемых изменений ДНК) и старение оказываются сопряженными процессами. Можно сформулировать как общее положение, что «вызываемое внутренними причинами повреждение ДНК, ведущее к мутагенезу, служит основным источником генетической нестабильности, связанной со старением и возрастными заболеваниями» (Xu G, Herzig M, Rotrekl V, Walter CA, *Base excision repair, aging and health span. Mech Ageing Dev. 2008;129(7-8):366-82*).

На основании анализа структуры ДНК в различных клетках было высказано предположение, что в мозге присутствуют два типа «возрастных» нейронов. Клеточные маркеры нейронов возрастного мозга значительно отличались как в отделах мозга, так и в типах клеток. Следует обратить внимание на степень уязвимости ДНК, присутствующей в митохондриях нейрона. Повреждение ДНК выражено в большей мере в митохондриях, нежели в ядре нейрона. И, как следствие, «закручивание» спирали порочного круга окислительный стресс - апоптоз.

Была выдвинута гипотеза, что некоторые типы нейронов обладают свойством накопления поврежденной ДНК, которая не подвержена репарации, поскольку эти клетки мало подвержены апоптозу. В противовес им существует другой тип нейронов, «уничтожаемых» с возрастом (или в ходе патогенеза). Характерно название публикации, где эта идея была обоснована: "The aging brain: less neurons could be better" («Возрастной мозг: меньше нейронов было бы лучше...»). И разделы публикации, по которым следует анализ проблемы: «Региональная уязвимость повреждений ДНК и репарация в возрастном мозге», «Потеря клеток как потенциальный протективный механизм возрастного мозга», «Возрастная гибель клеток, повреждение ядерной ДНК и селективное поражение при болезни Альцгеймера» (Rutten BP., Korr H, Steinbusch H.W., Schmitz CH. *The aging brain: less neurons could be better // Mechanisms of Ageing and Development. 2003;124(3):349-355*).

Таким образом, деструкции ДНК противостоит её репарация в митохондриях или в ядре нейрона, и этот процесс играет важную роль, поскольку состояние митохондрии определяет энергетический метаболизм клетки в целом, а ядерная ДНК служит основой репликационной функции. Выявлен биохимический механизм репарации (*base excision repair, BER*), включающий ликвидацию субпродуктов алкилирования, дезаминирования, окисления. Считается, что основными участниками системы BER являются ДНК-гликозилаза, АР-эндонуклеаза, ДНК-полимераза бета, ДНК-лигаза. Нарушение функции системы BER усиливает апоптоз, связанный со старением и нейродегенеративной патологией.

BER оказывается важной системой защиты мозга при ишемическом инсульте, в существенной степени определяющей исход заболевания. В экспериментах с фокальной ишемией мозга выявлено быстрое снижение активности BER, включая общую активность системы, апуриновой эндонуклеазы и активности ДНК-полимеразы-бета. Использование умеренной гипотермии (33 °C), как средства профилактики инсульта, способствовало восстановлению активности BER, что выражалось в снижении фосфорилирования АР-эндонуклеазы и полимеразы-бета. В постмортальном материале пациентов болезни Альцгеймера выявлено снижение активности BER (Luo Y, Ji X, Ling F, Li W, Zhang F, Cao G, Chen J6 *Impaired DNA repair via the base-excision repair pathway after focal ischemic brain injury: a protein phosphorylation-dependent mechanism reversed by hypothermic neuroprotection. Front Biosci. 2007 ;12:1852-62*).

На **рисунке 6** представлены экспериментальные данные возрастных изменений ДНК в клетках различных регионов мозга крыс. Совпадающими оказываются снижение биосинтеза митохондриальной ДНК и снижение репарации поврежденных молекул ДНК.

РИС.6. РЕГИОНАЛЬНАЯ КАРТИНА ИЗМЕНЕНИЙ ДНК В МОЗГЕ СТАРЫХ КРЫС

("The aging brain: less neurons could be better" B.Rutten et al. /CH.Schmitz/ Mech Ageing Devel. 2003;124:349).

Cerebral cortex	All pyramidal cells	+	+	+	-	+
	Layer V cells	+	+		-	+
Hippocampus	Granule cells		+	+	-	+
	CA pyramidal cells	+	+		-	+
Olfactory bulb						
	Mitral cells	+	-		+	-
Cerebellum						
	Purkinje cells	+	-	-	+	-

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ К МОЗГЕ:

Редукция биосинтеза митохондриальной ДНК

Снижение репарации нейрональной ДНК

Накопление нерепарируемой ДНК

Гибель клеток

Образование фибриллярных клубков

Клетки коры мозга, клетки гиппокампа оказываются подверженными образованию фибриллярных клубков. Для этих же структур характерно накопление нерепарируемой поврежденной ДНК. Сравнение с клетками Пуркинью (мозжечок) и клетками ольфакторной бульбы служит своеобразным «контролем»: редукция биогенеза митохондриальной ДНК сопряжена с программируемой смертью этих клеток. Существенно, что «затоваривание» функционально недостаточными нейронами (с не репарированной, но деструктурированной ДНК) относится, прежде всего, к структурам, связанным с реализацией памяти и когнитивных функций, – гиппокампа и коры мозга.

Однако это явление, по-видимому, не носит абсолютного характера: на постмортальном материале человека и приматов не было выявлено возрастной потери нейронов в энторинальной коре или в CA1 зоне гиппокампа, регионах связанных непосредственной с когнитивной функцией (**West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in normal ageing and Alzheimer's disease. Lancet. 1994;344:769–772**). По-видимому, часть нейронов с высоким уровнем повреждений ядерной ДНК уничтожается здесь за счет апоптоза и, таким образом, соотношение «повреждение ДНК \\\ репарация ДНК \\\ уничтожение клеток» оказывается основной детерминантой физиологического старения.

Другое направление исследований принимает во внимание возможность снижения когнитивных функций стареющего мозга за счет прогрессирующей утраты дифференцировки нервных клеток и формирования их отростков, сопряженных с расстройствами синаптической функции. В гистологическом материале возрастных особей

(людей и приматов) выявлено снижение количества дендритных шипиков и плотности самих дендритов пирамидальных клеток коры мозга (**Barnes CA. Normal aging: regionally specific changes in hippocampus synaptic transmission. Trends Neurosci. 1994;17:13–18; de Brabander JM, Kramers RJ, Uylings HB. Layer-specific dendritic regression of pyramidal cells with ageing in the human prefrontal cortex. Eur J Neurosci. 1998;10:1261–1269].**

Проблема накопления в нейронах поврежденной ядерной ДНК или их уничтожения имеет прямое отношение к пониманию патохимических механизмов нейродегенеративной патологии. В постмортальном материале пациентов с болезнью Альцгеймера обнаружено, что формирование нейрофибриллярных сплетений относится к тем же клеткам, где накапливаются нейроны с поврежденной и нерепарированной ДНК. Высказывается гипотеза, что селективная нейрональная уязвимость при БА связана с тем, что некоторые типы клеток с нерепарируемой ДНК не подвержены апоптозу и потому становятся уязвимыми к депозиции нейрофибриллярных отложений. Напротив, другие типы нейронов (например, клетки Пуркинье мозжечка) оказываются защищенными от таких морфологических «вторжений», поскольку в период физиологического старения они подвержены значительной апоптической деструкции (**Ugolini G, Cattaneo A, Novak M. Co-localization of truncated tau and DNA fragmentation in Alzheimer's disease neurons. Neuroreport. 1997;8:3709–3712).**

Накопление с возрастом повреждений ядерной ДНК ассоциируется с пониженной способностью к её репарации. Трансгенные животные с ускоренным старением демонстрируют «старческий» фенотип дефекта репаративного потенциала ДНК, тогда как мыши с замедленным старением, напротив, обнаруживают меньшие признаки апоптоза и большую продолжительность жизни (**Best BP. Nuclear DNA damage as a direct cause of aging. Rejuvenation Res. 2009;12(3):199-208).**

Таким образом, в качестве основного патохимического механизма старения рассматривается соотношение накапливаемых с возрастом поврежденных молекул ДНК и возможности их репарации, а с другой стороны, селективное уничтожение функционально «негодных» нейронов. Эти процессы являются также причиной формирования характерных для «возрастного мозга» нейродегенеративных заболеваний – сосудистой деменции, болезней Альцгеймера, Паркинсона и др. Однако следует иметь в виду, что начальной причиной повреждения ДНК остается окислительный стресс. Важно отметить, что связанные с «агрессивным» кислородом повреждения митохондриальной ДНК выражены изначально и в большей мере, чем повреждение ядерной ДНК.

Нарушение клеточного цикла. Одним из существенных механизмов клеточной гибели и развития нейральной патологии рассматривается индукция клеточного цикла в зрелых нейронах. Обоснована гипотеза, что в процессе старения и при развитии нейродегенеративных процессов гибель нейронов связана с изменениями механизмов, контролирующих деление клетки.

Сигнализация, исходящая от митогенных стимулов (факторы роста) и её превалирование над экспрессией факторов дифференцировки (цитокины) определяет возможность ускоренной инициации клеточного цикла. Основными здесь являются комплексы специализированных белков клеточного цикла – так называемые циклины и циклин-зависимые протеинкиназы. Предполагается, что в зрелой клетке ключевой фазой нормального цикла, является фаза G1, вступление в которую означает выбор «рыцаря на распутьи», определяющего:

(а) вступление клетки в фазу репликации; (б) остановку цикла для ликвидации повреждений ДНК; (в) ослабление регуляции клеточного цикла и его абберантная активация в нейронах; (г) запуск программируемой гибели клетки. Инициация клеточного цикла в этих ипостасях регулируется балансом митогенных стимулов. Важную роль играют дефицит нейротрофинов, снижение уровня гомоцистеина, потеря синаптических контактов, гипоксия (М.С.Попова, М.Ю.Степаничев. *Индукция клеточного цикла, амилоид-бета и свободные радикалы в механизме развития свободно-радикальных процессов в мозге. Нейрохимия, 2008:25(3):1–9*).

Ослабление регуляции клеточного цикла и его абберантная активация в нейронах являются типичными для старения и прогрессирования нейродегенеративных процессов. Установлено, например, что повреждение ДНК нейробластомы большими дозами дофамина ведет к остановке деления клеток с последующей гибелью по p35 - зависимому пути апоптоза (Da-Zhi Liu, Bradley P., Sharp FR. *Cell cycle inhibition without disruption of neurogenesis is a strategy for treatment of central nervous system diseases. Neurobiology of Disease. 2010 ;37(3):549-557*).

Развивается идея, что развитие нейродеструктивных процессов в мозге – возрастных или патологических - происходит как нарушение циклов деления клеток. Приводятся доказательства, что воспроизведение стадий нейронального цикла подвергается расстройству на медиаторном уровне, контролируемом нейротрофинами. Нейротрофические факторы (NGF, BDNF) влияют на остановку клеточного цикла как в нейрональных, так и других клетках организма; это влияние реализуется в митотическом цикле через тирозинкиназные нейротрофиновые рецепторы (p75^{NTR}), включающие

ТАБЛИЦА 2. РЕЗЮМЕ: БАЗОВЫЕ МЕХАНИЗМЫ СТАРЕНИЯ И НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНОЙ ПАТОЛОГИИ

- 1. Митохондриальная гипотеза «старения мозга»:** с возрастом увеличивается уровень оксидативных процессов в клетках, прогрессирующая дисфункция митохондрий и апоптоз.
- 2. Клеточные и молекулярные маркеры «возрастного мозга»** значительно различаются в отделах мозга и типах нервных клеток, что свидетельствует об избирательной «уязвимости» структур мозга к патологическим воздействиям.
- 3. Некоторые типы нейронов обладают свойством накопления нерепарируемых повреждений ДНК (unrepaired DNA).** Такие клетки мало подвержены апоптозу и потому «меньше нейронов было бы лучше» (Rutter B. et al. (2003) *“The aging brain: less neurons could be better”*.)
- 4. Индукция клеточного цикла в зрелых нейронах, В процессе старения и при развитии нейродегенеративных процессов гибель нейронов связана с расстройством механизмов, регулирующих процессы деления клетки.**

активацию сигнальных трансдукторных реакций, которые ведут к клеточной гибели **López-Sanchez N, Frade JM. Control of the cell cycle by neurotrophins: lessons from the p75 neurotrophin receptor. *Histol Histopathol.* 2002;17(4):1227-37).**

Анализируемые на основе этих воззрений данные побуждают к выявлению причин «сбивки» клеточного цикла как причины формирования нейральной патологии. Считается, что «испорченная» (абберантная) реэкспрессия белков клеточного цикла запускает механизм бета-амилоидной токсичности, как основы БА. Альтерация клеточного цикла может иметь место у пациентов с БА и в ненейрональных клетках. Лимфоциты таких больных обнаруживают при инкубации в культуре повышенную скорость пролиферации, ассоциируемую с G1/S инверсией и изменениями циклинового пути регуляции (**de la Cuevas, Minoz U. et al. Cell cycle and Alzheimer's disease: studies in non-neuronal cells. *J Appl Biomed* 2010;8(3):256-265).**

Эти данные приведены в качестве промежуточного резюме в таблице 2.

3. Патология возрастного мозга. Молекулярные и клеточные механизмы.

- Ишемическая патология. Инсульт в молодом и старом мозге.
- Нейродегенеративная патология. Болезнь Альцгеймера. Болезнь Паркинсона. Общие принципы начала заболевания и селективное поражение регионов мозга.
- Аутофагия – биологический феномен «двуликого Януса». Функция «мусорщика» или провокатора нарушений клеточного гомеостаза.
- Промежуточные итоги: молекулярные системы программы старения и нейродегенерации: промотирующие и защитные звенья.

3.1. Ишемическая патология. Инсульт в молодом и старом мозге.

Ишемический инсульт является следствием нарушения кровоснабжения мозга путем спастической или эмболической блокады кровотока. Ограничение кровотока ведет к церебральной ишемии, которая провоцирует целый каскад биохимических и клеточных событий, приводящих, в конечном счете, к гибели нейрональных структур и возникновению неврологического дефицита.

Согласно современным представлениям, ишемия мозга развивается по достаточно стереотипному сценарию, включающему связанные клеточно-молекулярные процессы:

- Ограничение кровотока (спазм, закупорка сосудов мозга).
- Энергетический дефицит в клетках мозга.
- Нарушение функции митохондрий в цитоплазме и ядре нейрона.
- Накопление гидроперекисей и токсических альдегидов.
- Дисбаланс медиаторов.
- Гиперэкспрессия возбуждающих молекул.
- Дисбаланс Ca^{++} .
- Активация проапоптотических каспаз. Запуск АПОПТОЗА.
- Деструкция ДНК.
- Накопление непродуктивных белков в нейронах.

- *Экспрессия аутофагии. Активное уничтожение клеточного материала.*
- *Некротические процессы в нейрональной ткани.*
- *Нарушение синаптической координации.*
- *Нарушение поведенческих и когнитивных реакций пациента.*

Возрастные изменения в мозге делают его особенно чувствительным к острому ишемическому инциденту. Патохимические механизмы, активирующие комплекс воспалительных процессов, нерегулируемый выброс токсических молекул (гиперактивация глутаматных рецепторов), дезорганизация баланса химических факторов синаптической пластичности, образование тканевого рубца, препятствующего росту новых аксонов и микрососудов – вот основной «набор» ситуаций при ишемическом инсульте. Опыты на животных (в стандартизированных условиях воспроизведения ишемического инсульта) показывают, что стареющие крысы обнаруживают более тяжелые признаки поражения и худшие показатели восстановления функций, нежели животные молодые. Развитие мозгового инфаркта у таких животных подтверждается ранним аккумулярованием BrdU-позитивных маркеров микроглии и астроцитов, ускоренным апоптозом, высокой степенью нейродегенерации. У пожилых более выражены размеры инфарктной зоны, и некроз характеризуется повышенным числом апоптотизированных клеток.

Клинический опыт показывает, что острая ишемия мозга, инсульт выражены в гораздо большей степени у *возрастных пациентов*, и восстановительный период требует у них более длительного времени и особого режима реабилитационных мероприятий. Эксперименты на крысах показали, что феноменология инсульта у старых крыс (при фокальной фототромботической ишемии коры мозга) выражена в большей степени. При стандартизированных условиях эксперимента у животных 20-месячного возраста отмечается более выраженное ухудшение поведенческих тестов и нарушений в сенсомоторной области, нежели у 3-месячных крыс. Этим изменениям соответствуют изменения в микроглии и олигодендроцитах, указывающие на нейрональную дегенерацию при активном апоптозе. Однако содержание животных в благоприятной среде (enriched environment) благоприятно сказывается на показателях восстановительной фазы. В этих условиях как у молодых, так и возрастных животных, заметны уменьшения зоны инфаркта мозга, количества пролиферирующих астроцитов, объема глиального рубца (**Buchhold B, Mogoanta L, Suofu Y, et al./ Environmental enrichment improves functional and neuropathological indices following stroke in young and aged rats. Restor Neurol Neurosci. 2007;25(5-6):467-84**). Ранняя экспрессия проапоптотических генов в сочетании с деструкцией ДНК в перинфарктной зоне объясняют менее эффективные возможности нейрореабилитации после инсульта у возрастных организмов. Анализ показывает, что регенеративный потенциал возрастного мозга сохраняется вплоть до глубокой старости, однако, экспрессия генов, определяющая синтез функционально необходимых молекул, оказывается ослабленной, имеет короткую длительность экспрессии и низкую амплитуду реализации.

В исследовании A.Buda и соавторов (**Buga AM, Dunoiu C, Baelseanu A, Popa-Wagner A., Cellular and molecular mechanisms underlying neurorehabilitation after stroke in aged subjects. Romanian J Morphology and Embryology. 2008;49(3):279-302**) проведено сравнение клеточных и молекулярных показателей мозга молодых и возрастных крыс, подвергнутых острой ишемии. Большинство этих показателей демонстрирует ухудшенные значения у возрастных животных. Отмечается ранняя активация окислительного стресса и апоптоза; дегенерация нейронов увеличена на ранней стадии ишемического процесса и восстановление функций оказывается отсроченным и неполным; резко активировано нейральное воспаление. Важно

также отметить увеличенное образование фрагментов β -амилоидного пептида, что косвенно указывает на ишемическую предтечу амилоидной нейродегенеративной патологии, к которой более чувствительны возрастные организмы.

В целом можно считать, что реакция на острую ишемию оказывается по большому спектру показателей более выраженной в патологическом отношении у возрастных организмов. Следствием этих различий оказывается более глубокая функциональная дизрегуляция и замедленное, неполное восстановление функций после инцидента острой ишемии мозга.

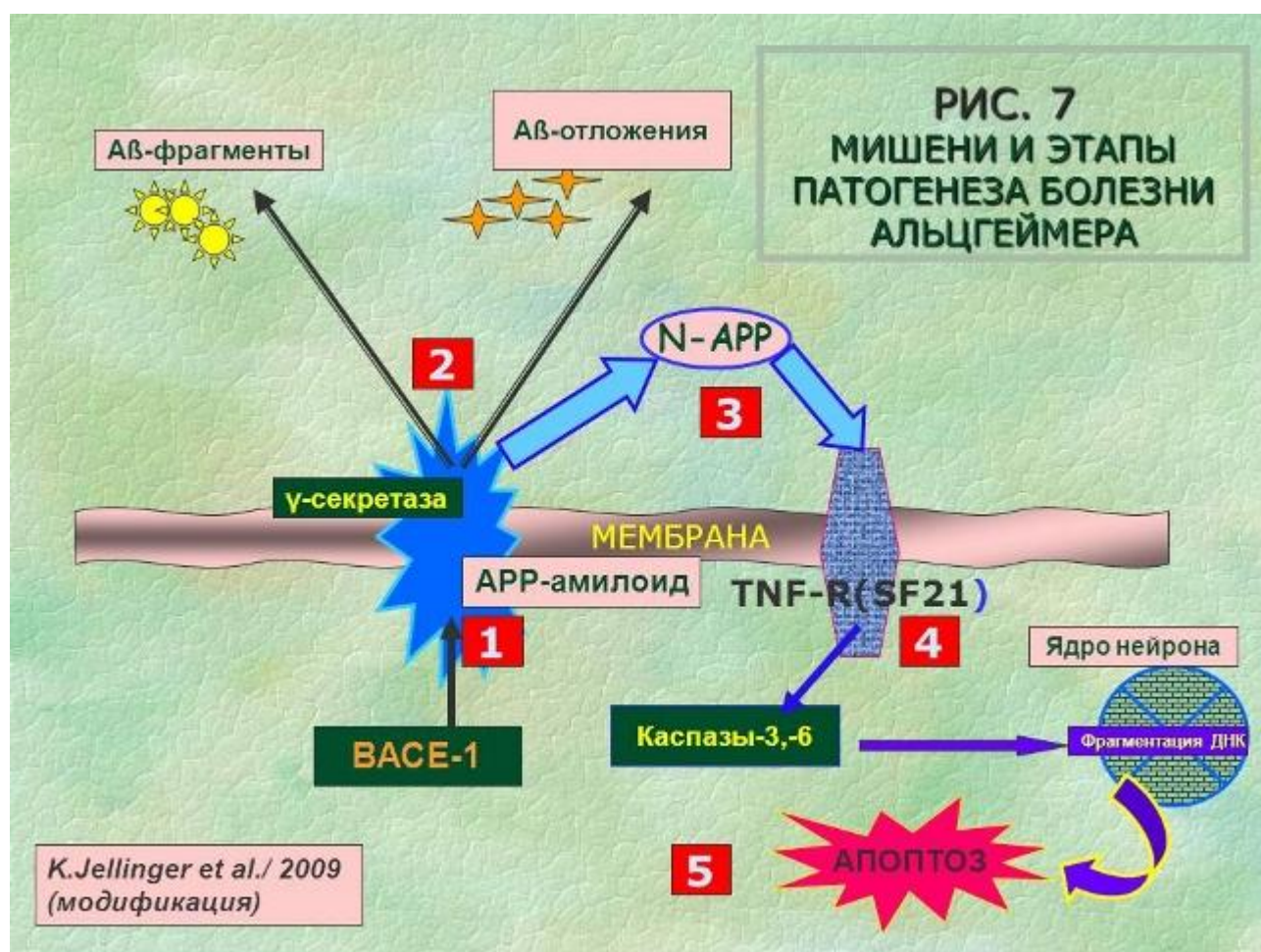
3.2. Нейродегенеративная патология. Болезнь. Альцгеймера. Болезнь Паркинсона. Общие принципы начала заболевания и селективное поражение регионов мозга.

Болезнь Альцгеймера (БА) – наиболее частая причина развития слабоумия (сенильная деменция альцгеймеровского типа), характерная для людей пожилого и старческого возраста. БА характеризуется нарастающими нарушениями когнитивных функций, личностными и поведенческими отклонениями статуса. БА сопряжена с прогрессирующей необратимой потерей части нейронального пула, в первую очередь, в коре мозга и гиппокампе, как следствие исходных клеточно-молекулярных аббераций в нейроне. Трудность лечения БА обусловлена комплексом взаимосвязанных причин. Патогенез, исподволь затрагивающий молекулярные изменения в мозге, отличается неуклонностью реализации на уровне отдельных клеток, региональных паттернов, зон мозга, функции мозга в целом.

Современная нейрохимия рассматривает несколько основных патохимических процессов, запускающих жестко детерминированное развитие БА. Можно полагать, что нарастающая с возрастом дисфункция митохондрий в нейрональной ткани оказывается сопряженной с образованием дефектных продуктов метаболизма амилоидных пептидов. Повышенная генерация токсического А β и гиперфосфорилирование белка tau являются ведущими факторами заболевания. Исследования на экспериментальных моделях и анализ постмортального материала пациентов БА показывают, что вызываемые А β структурные изменения митохондрий ведут к их фрагментации, апоптозу и в целом - к необратимым нарушениям структуры и функций нейрона (*Reddy PH, Manczak M, Mao P, et al./ Amyloid-beta and mitochondria in aging and Alzheimer's disease: implications for synaptic damage and cognitive decline. J Alzheimers Dis. 2010;20 Suppl 2:S499-512*).

Цитомикроскопические исследования показывают, что «усеченный» С-концевой участок APP накапливается в транспортных каналах митохондрий, затрагивая преимущественно нейроны холинергического, дофаминергического, ГАМК-ергического и глутаматергического фенотипов у пациентов III-й категории БА. К тому следует добавить, что, как свидетельствует генотипический анализ, пациенты БА с определенными типами аллелей (E3/E4) имеют более высокие концентрации митохондриального APP (*Devi L, Prabhu BM, Galati DF, et al/ Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. J Neurosci. 2006;26(35):905*). Следствием этих явлений оказываются нарушения функции синапсов, их атрофия и дезорганизация нейротрансмиттерной системы мозга.

Большой объем информации указывает на роль апоптоза в БА. В постмортальном материале выявляются элементы фрагментированной ДНК, беспорядочные гранулы хроматина и съеденные бесформенные клетки. Внутриклеточная аккумуляция Аβ в эндоплазматическом ретикулуме или эндосомах нейронов может активировать апоптотический механизм с изменением соотношения каспазных белков и их ингибиторов. В качестве конкретной иллюстрации отмечается дисбаланс про- (Bax, Bak и Bad) и анти- (Bcl-2 и Bcl-x_L) каспазных ферментов. Иммунохимический анализ документирует также сниженную экспрессию некоторых антиапоптотических генов. Накопление каспаза-сопряженных молекул выявлено вокруг сенильных и нейрофибриллярных структур. Каспазы играют непосредственную роль в процессинге белка амилоидного предшественника и образовании Аβ. Как показывают исследования на модели БА, каспазы могут быть причастны к механизму tau-опосредованной нейродегенерации (*Calissano P, C Matrone, and G Amadoro. Apoptosis and in vitro Alzheimer disease neuronal models. Commun Integr Biol. 2009; 2(2): 163–169*).



Исходно метаболизм APP осуществляется с помощью α - и β-секретаз, ферментов, гидролизующих эту макромолекулу. При этом большая часть метаболических превращений амилоидного предшественника в мозге следует по этому пути. В результате образуется растворимая форма sAPPα, участвующая в контроле релизинга глутамата, синапсотрофической функции и экспрессии нейропротективных генов. Второй путь гидролиза APP приводит к образованию комплекса пресенилина (Аβ отложения) и морфологическим пертурбациям с последующим развитием нейрональной дисфункции

(РИС. 7). Как следует из рисунка, APP-расщепляющий фермент (BACE1) совместно с γ -секретазой гидролизует APP с образованием A β и растворимого N-концевого пептида N-APP. Последний является специфическим лигандом рецептора некротического фактора опухоли /TNF-R(SF21)/ и промотирует активацию каспазы-6, фермента апоптической деструкции (*Jellinger KA. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. J Neural Transm. 2009;116:1111–1162*).

Однако, по данным некоторых исследователей, остается не вполне выясненной причинно-следственная связь между каспазным механизмом и образованием A β . Можно допустить, что увеличивающаяся с возрастом дисфункция митохондрий ведет к инициации апоптоза, который при участии каспазы включается в «ненормальные» превращения APP. По-видимому, эти реакции развиваются относительно избирательно как в отношении определенных групп людей (подверженных заболеванию БА), так и во временном аспекте, прогрессируя на раннем или позднем этапах жизни. Тем не менее, сопряженность патохимических механизмов БА и способность «закручивать» циклы порочных кругов заболевания, включающего по нарастающему рефрену молекулярные, клеточные, тканевые, когнитивные, поведенческие звенья, может быть документирована достаточно убедительно. Что касается терапевтического аспекта, то приведенная информация предоставляет много точек («мишеней») возможного вмешательства в патогенез на различных уровнях. Понимание базовых – молекулярных, клеточных и генетических причин БА – служит здесь основой для разработки подходов *превентивной терапии* возрастной нейродегенеративной патологии.

Болезнь Паркинсона (БП) – нейродегенеративное заболевание, «дрожательный паралич», которое характеризуется тремором, мышечной ригидностью, замедленностью двигательных реакций и постуральной нестабильностью. Ведущей патологической причиной БП является гибель дофаминергических нейронов в черной субстанции среднего мозга.

Результаты клинических и экспериментальных наблюдений свидетельствуют о сложном комплексе причин, вовлекаемых в патогенез БП. Среди таковых определенное место принадлежит окислительному стрессу, апоптозу и аутофагии, как базовых патобиохимических процессов. Возрастной аспект данного заболевания ассоциируется с ослаблением центрального тонического контроля и прогрессированием соматических нарушений.

Молекулярные причины БП реализуются как цепь событий, включающих нарушение работы митохондрий клеток мозга, гиперрилизинг глутамата, изменение структуры функциональных белков («мисфолдинг»), их агрегация, включение в цитоплазму нейронов телец Леви. Они содержат в своей структуре белковые нейрофиламенты и видоизмененный альфа-синуклеин. Тельца Леви характеризуются как специфический признак БП, они локализованы, как правило, в субкортикальных структурах черного вещества, голубого пятна, дорзальном ядре блуждающего нерва, базальном ядре Мейнерта. Клинические наблюдения показывают, что у пациентов БП уровень экспрессии альфа-синуклеина в митохондриях черной субстанции много выше, чем у здоровых людей. Пресинаптический белок альфа-синуклеин при гиперэкспрессии образует микрофибриллы, блокирующие поры митохондрий. Дофамин, присутствующий в цитозоле клеток черной субстанции, взаимодействуя с альфа-синуклеином, способствует трансформации протофибрилл в фибриллы. Выделяется роль особых белков – убиквитинов, которые при комбинации с альфа-синуклеином увеличивают деградацию нейронов.

Дисфункция митохондрий служит исходной причиной дегенерации дофаминовых клеток черной субстанции. Однако мутационные изменения митохондрий, ведущие к деструктивным процессам, имеют место и в других тканях, включая миокард, скелетные мышцы, кору мозга. Специфичность дегенеративных процессов именно в дофаминовых клетках черной субстанции сопряжена с вовлечением дополнительных факторов, делающих эти структуры избирательно уязвимыми.

В клетках черной субстанции при БП обнаруживаются маркеры *активации микроглии*. Дофаминовые клетки экспрессируют рецепторы некоторых цитокинов (интерлейкина-1 β , фактора некроза опухоли- α , интерферона- γ). Однако активация цитокинов сопряжена с экспрессией ферментов, провоцирующих образование активных форм кислорода. Таким образом, поражение дофаминовых нейронов черной субстанции сопряжено с релизингом продуктов, которые промотируют активацию микроглиальных клеток и ведут к развитию локальных нейровоспалительных реакций, способствующих нейродегенерации.

Нейральное воспаление имеет место и при других нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезнь Альцгеймера, Гентингтона, боковой амиотрофический склероз, и оказывается общей нейропатологической детерминантой гибели нейронов определенных зон мозга.

Причина **избирательного поражения** нейронов черной субстанции, средних шипиковых нейронов полосатого тела и моторных нейронов спинного мозга остается не вполне понятной. Гибель клеток при БП отмечается не только в черной субстанции, но и в не- дофаминергических структурах: норадренергическом locus coeruleus (голубом пятне), холинергическом базальных ядрах Мейнерта, серотонинергическом raphe nucleus, в нейронах периферической нервной системы. Эта селективность может быть связана с особенностями кальциевого гомеостаза и изменениями уровня Ca^{++} - связывающих белков в клетке (*González-Hernández T, Cruz-Muros I, Afonso-Oramas D. et al. Vulnerability of Mesostriatal Dopaminergic Neurons in Parkinson's Disease. Front Neuroanat. 2010;4:140*). Дополнительным объяснением селективной уязвимости дофаминовых нейронов могут служить данные, что активация кальциевых каналов L-типа в определенный период увеличивает их чувствительность к митохондриальным токсинам, среди которых первостепенную роль играют пероксидные радикалы (*Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J. Calcium, cellular aging, and selective neuronal vulnerability in Parkinson's disease. Cell Calcium. 2010;47(2):175-82*).

Констатация БП как *возрастной патологии* документируется следующими основными позициями.

(1) Болезнь Паркинсона представляет собой спорадическую форму возрастного дегенеративной патологии. По данным статистики в возрасте от 50 до 70 лет число пациентов БП увеличивается с 20 до 120 человек (на каждые 100 тысяч населения).

(2) Тельца Леви, которые рассматриваются как маркерные элементы данного заболевания, обнаруживаются также в возрастном мозге без диагностирования БП.

(3) Окислительный стресс и связанные с ним митохондриальная дисфункция и апоптоз, рассцениваются, как было представлено выше, в качестве источников причин возрастной нейрональной дезорганизации любой этиологии.

Считается, что интенсивность окислительного фосфорилирования, реализуемого митохондриями, в дофаминергических нейронах черной субстанции ускоряется с возрастом. В качестве не вполне доказанного положения следует принять во внимание, что потребность этих нейронов в интенсивном метаболическом обеспечении с возрастом выражена гораздо больше, чем в нейронах других типов. По крайней мере, как свидетельствуют гистологические данные, уровень апоптоза в дофаминергических клетках

оказывается существенно выше, нежели в нейронах других типов (*Hindle JV. Ageing, neurodegeneration and Parkinson's disease. Age Ageing 2010;39(2):156-161*).

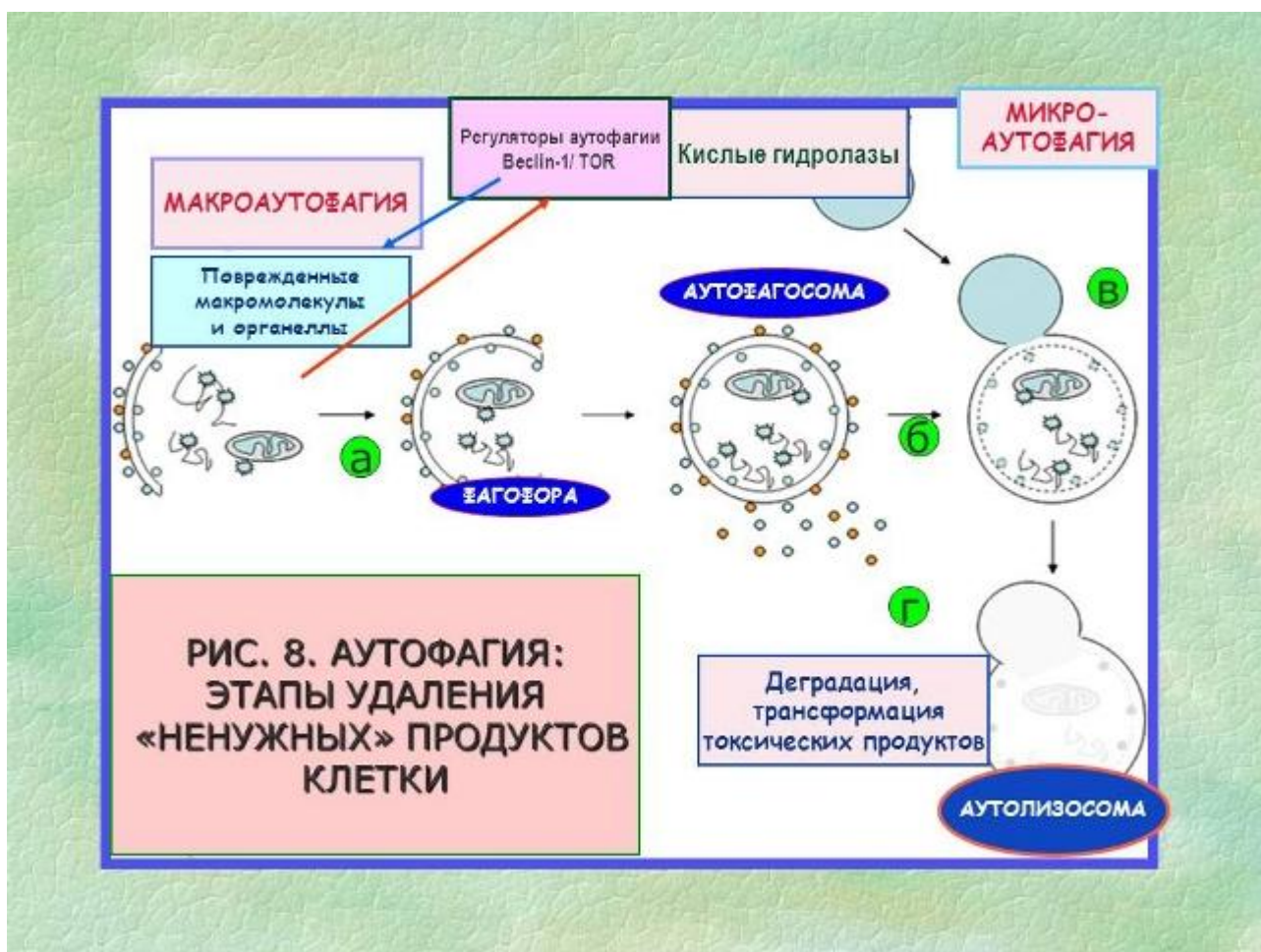
Таким образом, несмотря на почти двухсотлетний срок, прошедший со времени описания Джеймсом Паркинсоном заболевания, этиопатогенез БП оставляет много неясностей. Представление БП как мультикаузального расстройства нервной и мышечной системы с акцентированием генетических, возрастных и средовых факторов не вносит существенной ясности, позволяющей строить эффективную стратегию терапии. Растущая информация о молекулярном базисе нейродегенеративных расстройств вообще, связанном с митохондриальной дисфункцией, оказывается достаточно логичной. Однако эта идея нуждается в конкретизации и объяснении избирательности поражения особых групп клеток при БП. Сведения о Ca^{++} -зависимой дофаминовой «перегрузке» могут рассматриваться как возможность «запуска» окислительного стресса в дофаминовых клетках черной субстанции при старении и болезни Паркинсона (*Chan CS, Gertler TS, Surmeier DJ. A molecular basis for the increased vulnerability of substantia nigra dopamine neurons in aging and Parkinson's disease. Mov Disord. 2010;25 Suppl 1:S63-70*).

3.3. Аутофагия – биологический феномен «двуликого Януса». Функция «мусорщика» или провокатора нарушений клеточного гомеостаза.

АУТОФАГИЯ – биологический процесс, посредством которого компоненты клетки подвергаются деградации под действием собственных лизосомальных ферментов. Этот естественный повсеместный процесс служит важным регуляторным механизмом ликвидации поврежденных органелл, внутриклеточных патогенов и токсинов, а также аномальных белков. Аутофагия способствует оздоровлению клеточного пула или, наоборот, может быть фактором его разрушения.

Аутофагия представляет иную, не-апоптическую, форму программируемой клеточной гибели. В некоторых клеточных системах аутофагия является резервным механизмом гибели, в тех ситуациях, когда апоптоз в клетке заингибирован. И наоборот, если с помощью депривации (клеточного голодания) заблокировать процесс аутофагии, апоптоз становится основным механизмом ликвидации «ненужных клеток». Можно полагать, что сбалансированная аутофагия препятствует развитию старения; поскольку регулярное обновление цитоплазматических структур и молекул очищает и «оздоравливает» клеточный пул в целом, способствуя поддержанию стабильности генома.

Аутофагия – неперенный процесс, сопровождающий клеточное старение. Аутофагосомы накапливаются в стареющих фибробластах, содействуя обновлению веществ цитоплазмы и её органелл. Функция аутофагии снижается с возрастом, что увеличивает риск дегенерации нейронов, связанный с накоплением подверженных к агрегации мутантных белков. Возрастные изменения в митохондриях и аутофагия оказываются сопряженными звеньями процесса старения. Накапливающиеся с возрастом мутации митохондриальной ДНК уменьшают фрагментацию митохондрий, приводя к образованию ненормально больших (а, следовательно, функционально неполноценных) этих структур. Такие «гигантские» митохондрии отличаются резко сниженным уровнем АТФ, повышенным образованием АФК и нивелированной аутофагией (*Brunk UT, Terman A. The mitochondrial-lysosomal axis theory of aging: accumulation of damaged mitochondria as a result of imperfect autophagocytosis. Eur J Biochem. 2002 Apr;269(8):1996-2002*).



На **рисунке 8** представлены основные этапы аутофагии. (а) Процесс макроаутофагии начинается с экспрессии сигнальных белков и образования двумембранной структуры, которая изолирует растворимые белки и части клетки. (б) Упаковывание материала в пузырьки (везикулы), именуемые аутофагосомами. (в) Этап микроаутофагии: лизис аутофагосом при соединении с лизосомами и образование новой «контейнерной» структуры – аутофаголизосомы. (г) Деградация материала внутри аутофаголизосомы катепсинами и кислыми гидролазами. (д) Реутилизация высвобожденных биомолекул.

Таким образом, аутофагия обеспечивает ликвидацию поврежденных органелл клетки и может рассматриваться как способ упорядочения клеточного пула. С биологической точки зрения аутофагия является механизмом адаптации посредством сохранения (выживания) «здоровых» структур и селекции функционально негодных молекулярных и субклеточных компонентов клетки организма. Однако, при низком уровне аутофагии, когда массовое накопление токсических продуктов превалирует над их элиминацией, ситуация характеризуется как ускорение процесса старения (ткани, организма в целом) и/или развития заболевания. С нынешних позиций аутофагия может рассматриваться как подход в терапевтической стратегии некоторых заболеваний, в первую очередь, канцерогенеза и нейродегенеративных расстройств (**Galluzzi L, Vicencio JM, Kepp O, et al. To die or not to die: that is the autophagic question. Curr Mol Med. 2008;8(2):78-91**). Приводимая ссылка имеет красноречивый, почти шекспировский заголовок – «*To die or not to die: that is the autophagic question*».

Аутофагия и нейральная патология. Недостаточная аутофагия ассоциируется с прогрессированием нейродегенеративных заболеваний, сопровождающихся аккумуляцией «испорченных» белков. Длительное время оставалось загадкой, почему накопление молекулярных агрегатов и нейротоксичность присущи преимущественно поздней фазе жизни человека. Ныне это обстоятельство связывается с недостаточной ликвидацией «белкового шлака» за счет ограниченной аутофагии. Большое число доказательств выявляет этапные признаки аутофагии при болезни Альцгеймера или болезни Паркинсона, сосудистой деменции, ишемическом поражении (включая инсульт), травмах мозга. Финальной стадией аутофагии является гидролиз изолированного («дефектного») клеточного материала в аутофаголизосомах. Нарушение аутофагального клиренса отмечается при многих неврологических заболеваниях, как результат низкой активности лизосомальных гидролаз. Снижение активности ферментов катепсинового ряда приводит к повышенному апоптозу и тяжелой атрофии мозга (*Shacka, J. J., Klocke, B. J., Young, C., et al/ (2007) Cathepsin D deficiency induces persistent neurodegeneration in the absence of Bax-dependent apoptosis. J. Neurosci. 27, 2081-2090*).

Одна из теорий патогенеза БА связывается с дисфункцией аутофагального механизма, когда болезнь провоцируется отложением абберантных белковых агрегатов. БА, как наиболее общая форма нейродегенеративной патологии, характеризуется образованием двух основных форм агрегатных продуктов: tau-белка и Аβ. Развитие «ненормальной» аутофагии происходит вследствие аккумуляции аутофаговых вакуолей, содержащих Аβ. В мозге пациентов БА отмечается ранняя активация эндоцитозного механизма как ранней манифестации заболевания. Нейроны, которые обладают высокой чувствительностью, оказываются первыми жертвами «ненормального» эндоцитоза, что цитологически выражается в увеличении размера ранних эндосом; в этих крупных эндосомах с помощью иммунопозитивного маркера и выявляется Аβ (*Cataldo AM, Barnett JL, Pieroni C, Nixon RA. Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis. J Neurosci. 1997;17:6142-6151*).

Получены доказательства активации аутофагии и образования аутофагосом в структурах мозга, подвергнутых ишемии. Предварительное введение крысам с ишемией мозга ингибиторов 3-метилаланина и бафлиомицина¹ или ингибитора лизосомального белка катепсина В (Z-FA-fmk) препятствовало аутофагии, ассоциированной с ишемическим повреждением ткани мозга (*Wen YD, Sheng R, Zhang LS, et al. Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. Autophagy. 2008;16;4(6):762-9*). Нейротрофический глиальный фактор (GDNF) и ростовой фактор гепатоцитов (HGF) обладали протективным действием при ишемическом повреждении мозга крыс. Эффект осуществлялся за счет нивелирования экспрессивной аутофагии: через сутки после окклюзии средней церебральной артерии по специальным маркерам отмечались признаки антиапоптотического и антиаутофагального эффектов ростовых факторов, а также значительно редуцировалась зона инфаркта (*Shang J, Deguchi K, Yamashita T. et al./Antiapoptotic and antiautophagic effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and hepatocyte growth factor after transient middle cerebral artery occlusion in rats. J Neurosci Res. 2010;88(10):2197-206*).

Ишемические и нейродегенеративные заболевания мозга сопровождаются образованием большого числа разнообразных токсических продуктов. Эти вещества могут существенно влиять на многоэтапный механизм аутофагии и усугубление патологии, и в том - первичное объяснение наблюдаемых противоречий в балансе про- или антиаутофагии, согласно описанных стадий. «Две стороны одной монеты» - так оценивается значение аутофагии в комплексе нейральной патологии (*Lee JA. Autophagy in neurodegeneration: two sides of the same coin. BMB Rep. 2009;42(6):324-30*).



Отметим также, что в этой теме практически отсутствуют данные клинических исследований и потому практический подход оценки аутофагии в каждый конкретный момент: (а) специфичности, (б) динамики и (в) интенсивности патологического инцидента - еще предстоит специальному решению. «Аутофагия в нейропротекции и нейродегенерации – вопрос баланса» - так формулируется ныне эта проблема (*Cherra SJ, Chu CT. Autophagy in neuroprotection and neurodegeneration: A question of balance. Future Neurol. 2008;3(3):309-323*). Что касается значения аутофагии для процессов старения, здесь имеется очень немного фактов. Можно в общем плане считать, что аутофагия стоит в одном ряду клеточно-молекулярных процессов (окислительный стресс, апоптоз), которые неизменно связаны с постепенной дезорганизацией сбалансированных физиологических процессов в организме. Как и для окислительного стресса и апоптоза, для аутофагии существенным оказывается «цена баланса»: «Где хранитель над правым плечом, хоронитель над левым...». Схема на рис. 9 показывает конкретные процессы, связанные с высоким, «нормальным» или низким уровнем аутофагии. Мера этих процессов хорошо документируется ныне с помощью биохимических маркеров или цитофлуоресцентной техники исследования. В итоге низкий

уровень аутофагии определяет нарастающее накопление токсических продуктов в клетке и ускоренное старение.

3.4. Промежуточные итоги: молекулярные системы программы старения и нейродегенерации: промотирующие и защитные звенья.

Комплекс типичных изменений, сопровождающих старение мозга, включает постепенное нарушение нейрональной организации: расстройство согласованного синтеза и релизинга нейротрансмиттеров, нарушение аксонального транспорта белков и регуляторных пептидов, дегенерацию синапсов, развитие нейрального воспаления и пролиферации глии и др. Эти процессы ведут к общему снижению «гомеостатического резерва мозга» («homeostatic reserve», термин введенный E.Toescu) рассогласованию физиологических процессов в мозге, формированию когнитивных расстройств и деменции (Toescu EC. *Normal brain ageing: models and mechanisms. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2005;360 (1464): 2347-54*).

Молекулярный базис этих процессов предопределен изменениями окислительного обмена, связанных с нарушением функции митохондрий. Митохондриальная гипотеза старения мозга декларирует, что с возрастом увеличивается уровень окислительных процессов в клетках, смещающихся в сторону образования высокого уровня АФК, с прогрессирующим апоптозом. Новым аспектом современных представлений о старении мозга оказывается концепция накопления «нерепарируемых» молекул ДНК: деструктурированные апоптозом и неспособные к восстановлению структуры фрагменты ДНК накапливаются в нейронах, «затоваривая» мозг функционально не годными клетками.

Современные концепции старения мозга выделяют «метаболическую тетраду» нарушений, предопределяющей постепенное развитие патологических событий: *дисфункция митохондрий > апоптоз > накопление нерепарируемых ДНК > аутофагия*. Эти процессы нарастают по мере снижения протективного потенциала каждого из элементов цепи и характеризуют в целом нарушение «гомеостатического резерва», ведущего, с одной стороны, к нарушению функции мозга по всем основным физиологическим параметрам, с другой – к выраженной уязвимости отдельных структур мозга к воздействию специфических патологических факторов. Новым взглядом на комплекс этих клеточно-биохимических процессов является их понимание *количественно/качественного* баланса. И окислительный стресс, и апоптоз (деструкция ДНК), и аутофагия складываются как защитный или «вредоносный» механизмы в зависимости от активности ведущих ферментов и уровня образования конечных продуктов. Нормальная балансирующая активность этих процессов, ограничивающая активность окислительного стресса, противодействующих каспазному механизму апоптоза, способствующих репарации поврежденных молекул ДНК или «убирающих» негодные структуры и целые клетки, с возрастом меняется в сторону доминирования патологических процессов, которые провоцируют развитие нейродегенеративных заболеваний или усугубление ишемических и травматических повреждений мозга. Следовательно, элементарная задача клинициста на этапе возрастных изменений состоит в поддержании защитных компонентов клеточного гомеостаза и, в первую очередь, нивелирования окислительных сдвигов, подготавливающих и реализующих дисфункцию митохондрий.

Нейрональная активность связана с увеличением уровня Ca^{++} в цитозоле и его накоплением в митохондриях, что, с одной стороны, играет положительную роль в стимуляции процессов окислительного фосфорилирования, а с другой - активирует процессы, ведущие к программируемой гибели клетки. Дисфункция митохондрий в

возрастном мозге связана с нарушением транспорта Ca^{++} , увеличением порогового уровня захвата Ca^{++} и постепенно нарастающей деполяризацией митохондрий.

Нарушение кальциевого гомеостаза в нейронах оказывается существенным моментом потери синаптической пластичности, связанной со старением. Одна из современных гипотез старения выделяет нарастающую дисфункцию с изменениями уровня кальция в нейроне (*Foster T. C. Calcium homeostasis and modulation of synaptic plasticity in the aged brain. Aging Cell 2007; 6: 319–325; Toescu E. C., Vreugdenhil M. Calcium and normal brain ageing. Cell Calcium 2009; 47:158–164*).

Долгое время концепция старения ассоциировалась с «нейродегенерацией» и патохимические механизмы различных видов нейрональных расстройств переносились на трактовку «нормального» процесса старения. Однако нынешние данные клинических и модельных исследований определенно различают биохимические, морфологические и функциональные компоненты, характеризующие старение и нейродегенерацию. Исследования постмортального мозга выявили значение токсического фрагмента Аβ и нарушений структуры митохондрий в качестве ведущих компонентов повреждения синапсов. Электронномикроскопические работы показали, что накопление Аβ в нервных терминалях влияет на синаптическую активность, включая релизинг медиаторов.

Таким образом, клеточный и молекулярный механизмы нейродегенеративной патологии включают порочный круг измененного метаболизма амилоидного белка (APP) и дисфункции митохондрий, ведущих к нарушению энергетического метаболизма и характерным морфофункциональным изменениями нейрональной сети (образование фибриллярных сплетений).

На материале БА человека и её трансгенной модели было установлено, что окислительное повреждение клетки *предшествует* депозиции амилоидного материала, и это явление оказывается общим для различных форм нейродегенеративной патологии. Окислительный стресс, связанный с образованием гидроперекисей и нейротоксических продуктов, приводит к включению механизма апоптоза, деструкции ДНК и программируемой гибели клеток при БА. Эти сведения приведены в обзоре (*Jellinger KA. Recent advances in our understanding of neurodegeneration. J Neural Transm. 2009;116(9):1111-62*).

Прогрессирующий уровень АФК, коррелирующий с возрастной динамикой человека, является следствием снижения антиоксидантного потенциала при БА. Признаки окислительного повреждения ДНК оказываются особенно выраженными в гиппокампе, регионе, первостепенно страдающим при БА. Комплекс процессов, связанных с митохондриальной дисфункцией и перерастающих в явления апоптоза и амилоидной токсичности, захватывает далее нарушения синаптической нейротрансмиссии, интегративности нейрональных мембран, нарушенного аксонального транспорта. Наконец, эти явления перерастают в расстройства высших функций ЦНС и служат причиной деменции и когнитивных расстройств. Все эти позиции сходства и различий патологических признаков (механизмов) старения и нейродегенерации представлены на **рисунке 10**. Общий вывод сводится к положению, что исходя из базовых причин «метаболической тетрады», события для старения без выраженных признаков патологических расстройств и для нейродегенеративных заболеваний, включают различные биохимические и физиологические процессы. Из этих представлений следует также, что нарастающие с возрастом процессы дисфункции митохондрий подготавливают ускоренное и более выраженное развитие дисциркуляторной энцефалопатии, ишемического и геморрагического инсульта, болезней Альцгеймера и Паркинсона, бокового амиотрофического склероза, психопатологических расстройств и др.

РИС. 10. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ СТАРЕНИЯ (слева) И НЕЙРОДЕГЕНЕРАЦИИ (справа) НЕ ИДЕНТИЧНЫ ...



Еще один важный механизм регуляции клеточного гомеостаза и, соответственно, влияния на процессы старения и нейродегенерации связан с аутофагией. Аутофагия представляет морфо-биохимический механизм ликвидации поврежденных митохондрий и содержащегося в них материала; этот процесс происходит в течение всей жизни индивидуума, варьируя в зависимости от предлагаемых жизненных обстоятельства (стрессорных воздействий и заболеваний). Ослабление с возрастом активности аутофагов и невозможности эффективно удалять дефектные митохондрии, осколки мембран и белков и др. - ведут к накоплению негативных последствий, которые суммируются в патологию различного генеза. Однако сложная морфо-биохимическая процедура ликвидации «шлакового» материала оказывается «двуликим Янусом», где функции «мусорщика или провокатора» нарушений клеточного гомеостаза разделены тонкой гранью участия регуляторных биохимических молекул. На основном уровне, по-видимому, существует деликатный баланс между ликвидацией поврежденных и образованием новых митохондрий. После голодания (форма физиологического стресса) наблюдается индукция аутофагии в поврежденных органеллах, в первую очередь, в митохондриях. В то же время, отмечается сопутствующая активация биогенеза митохондрий, которая обеспечивает необходимую продукцию АТФ и установление ионного баланса в клетке (*Vosler P.S., Graham H., Wechsler L.R., and Chen J./ Mitochondrial Targets for Stroke Focusing Basic Science Research Toward Development of Clinically Translatable Therapeutics. Stroke. 2009;40(9):3149–3155*).

Можно резюмировать основные выводы, следующие из представленного материала.

1. Нарушение функции митохондрий, связанной с ослаблением антиоксидантных систем клеток является исходной причиной развития старения. Дисфункция митохондрий провоцирует механизм апоптоза, программируемой смерти клеток, ведущей к гибели или ослаблению функций отдельных нейрональных популяций. Постепенно этот процесс захватывает всё большее число структур и процессов в мозге и провоцирует уязвимость нейронов к повторному (хроническому) влиянию повреждающих факторов. По этому патохимическому принципу разворачивается ишемическая патология мозга или нейродегенеративные процессы, связанные с формированием деменции Альцгеймеровского типа, паркинсонизма и других характерных возрастных заболеваний.

2. Клеточные и молекулярные маркеры «возрастного мозга» значительно отличаются в отделах мозга и типах нервных клеток (специфическая медиаторная «эргичность»), что свидетельствует об избирательной уязвимости определенных структур мозга к патогенным воздействиям. Одной из причин такой особенности групп нейронов оказывается индукция клеточного цикла в зрелых клетках. В процессе старения и при развитии нейродегенеративных процессов гибель нейронов связана с расстройством механизмов, регулирующих деление клеток.

3. Часть нейронов, подверженных апоптозу сохраняется благодаря процессу репарации поврежденной ДНК за счет специализированных биохимических реакций. Однако некоторые типы нейронов обладают свойством накопления нерепарируемых повреждений ДНК. Увеличение пула таких структур снижает физиологические способности мозга, уровень его пластичности и адаптационный потенциал в целом. Иными словами, в мозге «затоваренном» функционально недостаточными нейронами, создается ослабленный, дезорганизованный уровень реализации регуляторных процессов. Для возрастного мозга характерны определенные компенсаторные перестройки, нивелирующие грубые нарушения синаптических процессов. Однако именно такой механизм сохранения функционально негодных структур (с нерепарированными молекулами ДНК и/или ослабленной активностью аутофагии) является причиной развития когнитивных расстройств и других проявлений нейродегенеративной патологии.

4. Сопряженная «комбинация» молекулярно-клеточных процессов: окислительный стресс = апоптоз = репарация ДНК = аутофагия представляет единый, функционально подвижный комплекс процессов в работающих клетках любого типа. К структурам ЦНС, нейрональным, глиальным и другим клеткам это положение относится в наибольшей степени, ввиду специфичности их предназначения и высокой функциональной значимости для регуляции местных и генерализованных адаптивных процессов. Каждый из компонентов этой «тетрады» строится как противостояние активных и сдерживающих начал (образование АФК и антиокислительные реакции, каспазные и антикаспазные белки и т.п.). По мере старения организма в системе биохимических реакций происходят неизбежные сбивки, рассогласования, которые ослабляют регуляторный потенциал мозга в целом.

5. Вопреки существовавшему много десятилетий тезису, что «нервные клетки не восстанавливаются», в структурах мозга идет постоянный процесс нейрогенеза – трансформации эндогенных стволовых клеток нервной системы в настоящие клетки специальной принадлежности – нейроны, астроциты, олигодендроциты. Их трансформация, миграция в определенные регионы мозга и пролиферация стимулируются многими воздействиями физиологической и патологической значимости (от гипоксии до инсульта, от пребывания организма в благоприятной среде до травмы мозга...). С возрастом *регулируемый ростовыми и нейротрофическими факторами* нейрогенез ослабевает. Остается, однако, принципиальный на сегодняшний день вопрос о том, выполняют ли вновь образующиеся стволовые клетки роль «заплаток» (в местах повреждения или местах «функционального напряжения») или эти трансформирующиеся прогениторы работают как

«донаторы» физиологически активных веществ (тех же ростовых факторов и нейротрофинов), необходимых для поддержания функционального равновесия отдельных структур или регионов мозга.

Функция таких систем специализированных химических регуляторов мозга рассматривается в последующих разделах книги.

4. НЕЙРОТРОФИНЫ. ФАКТОРЫ ПЛЕЙОТРОПНОЙ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИЙ.

- *Нейротрофины. История открытия. Химическая структура и основные функции.*
- *Нейротрофины. Спектр функций, организующих работу мозга.*
- *Нейротрофины. Участие в ишемических и нейродегенеративных заболеваниях мозга. Возрастной аспект.*
- *Нейротрофины как регуляторный компонент программы старения.*

4.1. Нейротрофины. История открытия. Химическая структура и основные функции.

НЕЙРОТРОФИНЫ - семейство крупных полипептидов, которые регулируют выживание, развитие и функцию нейронов. Секретируемые нейрональными структурами (нейронами, глией), они выполняющие сигнальную миссию в большом спектре физиологических процессов. Нейротрофины осуществляют структурную и функциональную организацию, как отдельных клеток мозга, так и нейрональной сети в целом, являясь регуляторами нейрональной пластичности. Одна из основных функций нейротрофинов связана со способностью противостоять окислительному стрессу и апоптозу («программируемой смерти» клетки). Нейротрофины также служат важными регуляторами нейрогенеза, образования из прогениторных (стволовых) нейрональных предшественников новых клеток.

Современное представление классифицирует НЕЙРОТРОФИНЫ как семейство крупных полипептидов, которые регулируют переживание, развитие и функцию нейронов. В общепринятом понимании они рассматриваются как молекулы, секретируемые нейрональными структурами (нейронами, глией), выполняющие сигнальную миссию посредников в большом спектре физиологических процессов. Эта роль нейротрофинов выявляет их значение для организации нейропластичности синапсов и нервной системы в целом, как основного компонента адаптивной функции.

ИСТОРИЯ. Предтечей представлений о нейротрофической регуляции явились исследования С.Рамона-и-Кахаля, предложившего в 1892 году «хемоаффинную теорию». Кахаль суммировал знания того периода о структуре нейрона, включавшие представления о мембране, протоплазме, аппарате Гольджи, спонгиоплазме и нейрофибриллах, обратив особое внимание на нейрофибриллярные нити, названные им «нейробионами». Говоря современным языком, интранейрональные миофибриллы следует рассматривать как полимеры, связанные с белком тубулином - высоко динамичной молекулой, чувствительной к стимулам среды.

Развивая хемоаффинную теорию, С.Рамон-и-Кахаль охарактеризовал некий *нейротрофический фактор*, возникающий из Шванновских клеток. Испанский ученый полагал, что это вещество, стимулирует рост и ветвление нейронов. Нейротрофическая гипотеза Кахалья, изложенная им применительно к процессам дегенерации и регенерации нервной системы, скорее относится к так называемому *Neurite Extension Factor*, нежели к нейротрофинам и ростовым факторам в современном представлении. Однако прецедент для идеи был создан.

Еще одна выдающаяся личность, предопределившая развитие знаний о нейротрофических/ростовых факторах – итальянка, работавшая в США, Рита Леви-Монтальчини. Впечатляющая история многолетнего поиска и идентификации "*a retrograde trophic messenger and trophic factor*" описана ею в Нобелевской лекции. В 1951 году Р.Леви-Монтальчини после перерезки волокон симпатических нервных клеток куриного зародыша обнаружила их бурный рост при внесении экстракта опухолевых клеток. Эти результаты легли в основу гипотезы о наличии в раковых клетках вещества, стимулирующего рост нервной ткани, т.е. - "фактор роста". Он был назван Nerve Growth Factor, NGF (Фактор роста нервов), первый из большого семейства нейротрофических факторов (**РИС.11**).

РИС.11. ОТКРЫТИЕ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА

Проведя в 1951 году серию экспериментов совместно с биохимиком Стэнли Козном, Рита ЛЕВИ-МОНТАЛЬЧИНИ обнаружила перерождение и последующее бурное развитие симпатических нервных клеток при пересадке опухоли в куриный зародыш.

Эти результаты легли в основу гипотезы о наличии в раковых клетках вещества, стимулирующего рост нервной ткани, т.е. - "фактор роста". Он был назван **Nerve Growth Factor (Фактор роста нервов)**, первый из большого семейства нейротрофических факторов.

NGF был обнаружен во всех тканях и жидкостях организма, но более всего - в нервной ткани...



Р.Леви-Монтальчини заканчивает свою Нобелевскую лекцию 1986 года тезисом «Предсказуемые перспективы и прогноз непредсказуемого», где были на удивление точно предсказана судьба нейротрофинов и других ростовых факторов.

Первое. Речь идет о поиске NGF-подобных субстанций – пептидов или белков, обладающих трофической, хемотаксической и дифференцирующей активностью, подобной NGF, но кодируемых другими генами. Забегая вперед, заметим, что в последующие годы были открыты целые семейства таких веществ, новых химических регуляторов. Идея выявления фактора, способствующего регенерации поврежденных клеток и обладающего, как было постулировано, *нейротрофической активностью*, оказалась удивительно плодотворной. С помощью ростовых и нейротрофических факторов удалось определить значение клеточно-молекулярных процессов, в которых эти соединения играют большую роль. Нейротрофические ростовые факторы, как регуляторы, явились объединяющим началом для понимания сложной механики базисных процессов в клетке, значимых для роста, развития, старения и болезни организма.

Второе. Была предсказана особенная роль рецепторов NGF, *«которые, по-видимому, являются триггерами реализации клеточного ответа»*. Последующие исследования выявили не только большое разнообразие форм рецепторов, специфичных для связывания с нейротрофинами, ростовыми факторами и нейропептидами (регуляторными пептидами), но и определили множественную сеть альтернативных сигнальных процессов. Расшифровка этих путей сигнальной трансдукторной системы оказывается ныне на редкость плодотворной для понимания парадоксального сочетания универсальности (полимодалности) и специфичности физиологического действия этих веществ.

Третье положение исходило из обнаруженного Леви-Монтальчини факта, что перерезка нервного волокна стимулирует увеличение синтеза NGF в нейронах, что служит *«дополнительным указанием замечательной пластичности в контроле экспрессии гена Фактора. Вполне вероятно, что это свойство может модулироваться фармакологическими агентами, действующими по тому же пути, что и регуляция синтеза и рилинга NGF»*. Значимость этого вывода конкретизируется клиническим аспектом прогнозирования роли нейротрофических/ростовых факторов: *«...поскольку гибель клеток специфической нейрональной популяции связана со сниженным уровнем нейротрофических факторов, таких как NGF, их экзогенная поддержка или стимуляция эндогенного продуцирования фармакологическими средствами может открыть обещающие подходы терапии некурабельных заболеваний»*. С позиций сегодняшнего дня нельзя не удивиться точности такого предвидения, сформулированного Р.Леви-Монтальчини в ее Нобелевской лекции.

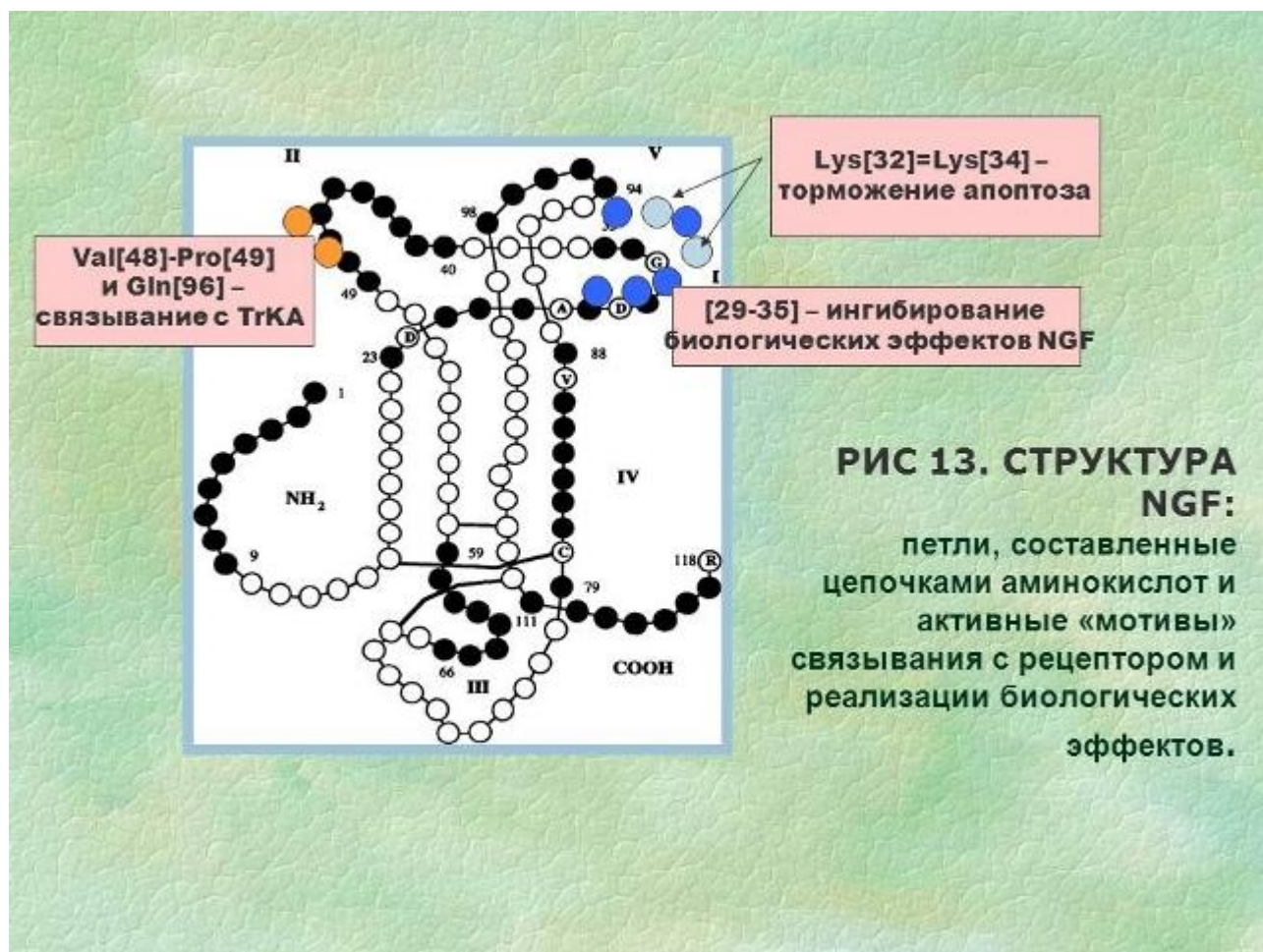
История изучения нейротрофинов и ростовых факторов насчитывает относительно короткий период; однако, стремительно растущая информация о многочисленных членах семейств этих полипептидных соединений, их химической структуре, биосинтезе и причастности к *любой функции* организма заставляют говорить о новом классе клеточных регуляторов. Для большинства представителей нейротрофических/ростовых факторов характерна способность контролировать процессы на уровне ядерного аппарата клетки, *стимулируя создание новых функционально значимых молекул и, соответственно, новых клеточных структур*.

Нейротрофины включают группы (подсемейства) структурно гомологичных пептидов, исходно оцениваемых по сходству с первым из открытых представителей ростовых факторов вообще – фактором роста нервов (NGF). Основанные на структурной гомологичности аминокислотных последовательностей, типичной также для цитокинов, нейротрофины делятся на три подсемейства: собственно “Нейротрофины”, куда относятся NGF, BDNF, NF-3, NF-4/5; подсемейство *глиального фактора*, которое включает: GDNF,

Neurturin (NTR), Artemin (ART), Persephin (PSP); подсемейство цилиарного (реснитчатого) фактора, включающего CNTF, ингибирующий фактор лейкемии (LIF) и интерлейкин-6 (IL-6). (РИС. 12).



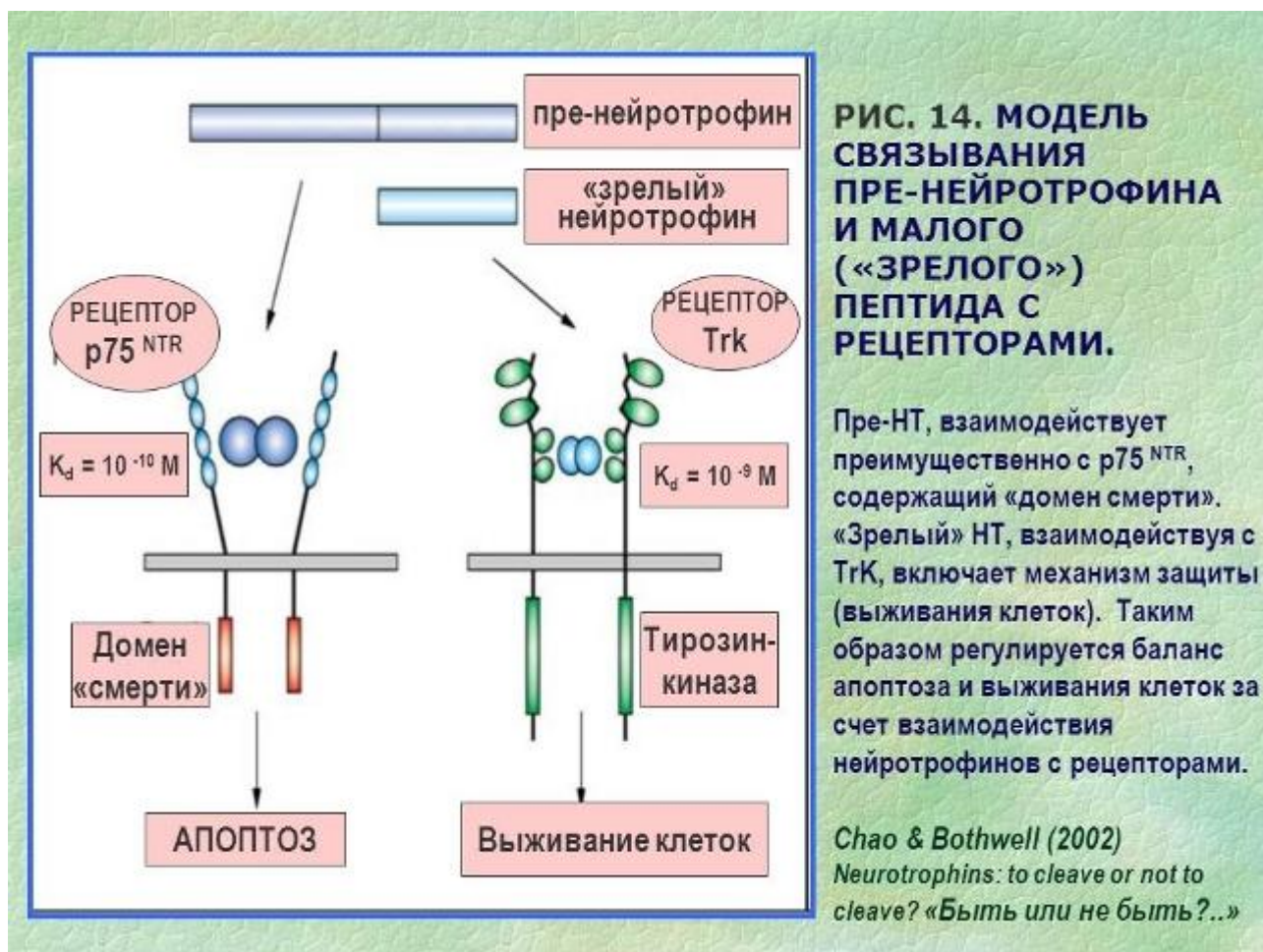
СТРУКТУРА. NGF представляет собой димер, содержащий две идентичные субъединицы по 118 аминокислотных остатков, с МВ около 26 кДа. (РИС. 13). Другой, весьма популярный нейротрофин - BDNF сходен по структуре и биохимическим превращениям. Он синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме как белковый предшественник с молекулярной массой 32 кДа и аминокислотной последовательность в 249 аминокислотных остатков. При последующей транспортировке в аппарат Гольджи пре-нейротрофин гидролизуется матриксными металлопротеиназами (плазмин, фурин). Упакованная в секреторный везикулы молекула «зрелого» нейротрофина присутствует в пресинаптических терминалиях аксонов и постсинаптических дендритов, откуда они высвобождаются в активной форме под влиянием Ca^{++} . Дальнейшая функция нейротрофина связана с регуляцией активности NMDA- или AMPA- рецепторов. Многочисленные данные свидетельствуют, что возрастные изменения в мозге сопровождаются сниженным синтезом молекул нейротрофинов и ослабленной экспрессии рецепторов.



Было установлено, что предшественник нейротрофина также влияет на физиологическое состояние нервной клетки. Содержание пре-NGF значительно увеличено в возрастном мозге, и эта более крупная, чем «зрелый» NGF структура, обладает нейротоксическими свойствами. Пре-NGF, соединяясь с регуляторным белком сортилином, стимулирует каскад реакций, приводящих к апоптозу (**РИС.14**). Содержание сортилина в нейронах старых животных заметно увеличено, что делает эти клетки более уязвимыми к действию пре-NGF. В постмортальном материале в мозге старых людей и пациентов болезни Альцгеймера обнаружено повышенное содержание пре-NGF (*Al-Shawi R, Hafner A, Chun S, et al./ ProNGF, sortilin, and age-related neurodegeneration. Ann N Y Acad Sci. 2007;1119:208-15*).

РЕЦЕПТОРЫ НЕЙРОТРОФИНОВ. Рецепторы оказываются «входными воротами» реализации биологических функций нейротрофинов. Природа позаботилась о большом разнообразии процессов, которые активируются после взаимодействия вещества (лиганда, нейротрофина) с рецептором, а также о наличии сопутствующих белков, которые модулируют активацию рецептора.

Эффекты нейротрофинов осуществляются при их взаимодействии с тирозинкиназными рецепторами - Trk-A, Trk-B, Trk-C. В то же время все названные выше нейротрофины взаимодействуют с «универсальным» p75^{NTR}. Различия в структуре рецептора определяют специфичность его связывания с лигандом. Обнаруживается некая преферентность связывания определенного нейротрофина с рецепторами. Например, NGF предпочтительно взаимодействует с Trk-A, а BDNF – с Trk-B, тогда как NT-3 с Trk-C или с Trk-A рецепторами. Принципиально то, что после соединения рецептора с лигандом

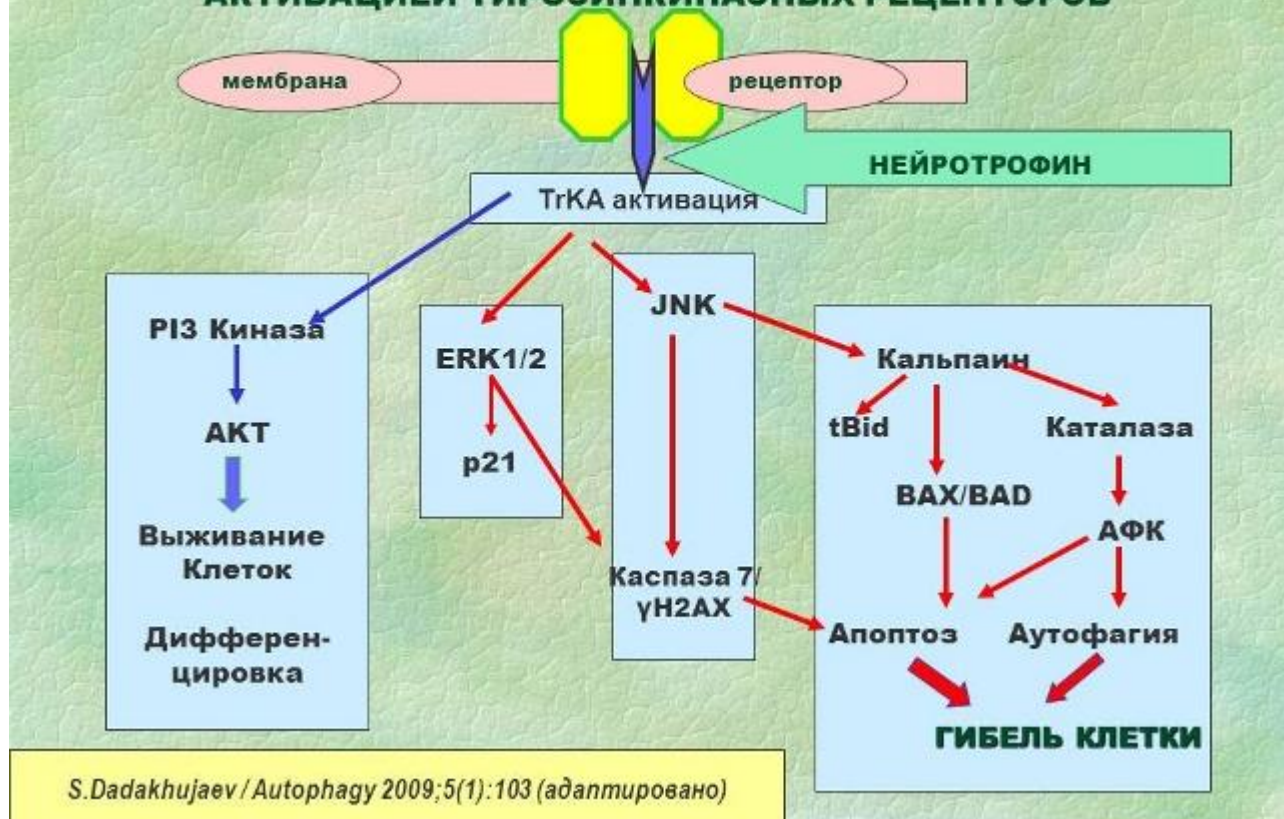


запускается каскад реакций, специфичных для этого типа контакта. Взаимодействие нейротрофина с рецептором определенного подтипа оказывается важным для характера последующей физиологической реакции. Соответственно, такие реакции определяют выживание клетки, индукцию апоптоза или защиту от него, процессы клеточной дифференцировки и пролиферации. Вариабельность этих процессов становится понятной после открытия белков-партнеров, модулирующих направление сигнальных реакций. Определены участки (домены) молекулы NGF, ответственные за такие процессы.

Связывание нейротрофинов с рецептором $p75^{NTR}$ приводит к активации транскрипторного фактора NF- κB , ключевой молекулы ДНК-сопряженного синтеза белков в ядре клетки. BDNF, способный связываться с Trk-B или с $p75^{NTR}$, запускает внутриклеточный сигнал, ведущий к выживанию или, напротив, гибели клетки (**РИС.15**). Эта информация получила большое развитие в последнее десятилетие, когда на основе структуры нейротрофинов после идентификации аминокислотных связок («мотивов») были созданы небольшие пептиды ("mini-peptides") способные осуществлять отдельные реакции целой нейротрофиновой молекулы. Концепция терапии «малыми пептидами» получает всё более аргументов в качестве препаратов нейротрофической терапии, и её подробное изложение будет представлено в главе 6.

Старение мозга характеризуется изменениями экспрессии тирозинкиназных рецепторов TrkA и рецептора $p75^{NTR}$. Активность TrkA доминирует у молодых крыс и смещается в сторону «предпочтения» $p75^{NTR}$ у возрастных животных. Такая перекодировка, связанная с липидным продуктом *ceramide*, вторичным посредником, ведет к стимуляции

РИС. 15. МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, РЕАЛИЗУЮЩИЕ ВЫЖИВАНИЕ ИЛИ ГИБЕЛЬ КЛЕТКИ, ОПОСРЕДОВАННЫЕ АКТИВАЦИЕЙ ТИРОЗИНКИНАЗНЫХ РЕЦЕПТОРОВ



синтеза Аβ пептида. У трансгенных мышей с ускоренным старением отмечается активация сигнального пути, характерного для превалирующей экспрессии $p75^{NTR}$ и увеличенная продукция Аβ в мозге (Costantini C, Scrable H, Puglielli L. An aging pathway controls the TrkA to $p75^{NTR}$ receptor switch and amyloid beta-peptide generation. EMBO J. 2006 May 3;25(9):1997-2006).

ФУНКЦИЯ. Исходно нейротрофины позиционируются как факторы, регулирующие развитие, дифференцировку и выживание отдельных популяций нейронов. С этими соединениями связывается понятие *нейротрофичности*, которое формулируется как **комплекс биохимических и физиологических процессов, способствующих функциональному сохранению структур мозга**. Понятие нейротрофичности включает:

- нейропластичность,
- нейропротекцию и
- нейрогенез –

как формы защиты от окислительного стресса, апоптоза и других форм нейрональной деструкции. Функции нейротрофических факторов в мозге охватывают большой спектр процессов, что позволяет говорить о **плейотропности** этих соединений. Конкретное представление этих положений дано на **РИС.16**.

Многие физиологические феномены были выявлены в экспериментах с разрушением или ингибированием синтеза эндогенных нейротрофинов, или, наоборот, внесением контролируемых количеств полипептида в мозг, срезы нервных клеток, культуру нейронов. Эти исследования представили уникальный материал, позволяющий достоверно, в стандартизованных условиях характеризовать клеточные и молекулярные механизмы

РИС. 16. ФУНКЦИИ НЕЙРОТРОФИНОВ В МОЗГЕ

(1) Организация и контроль синаптической консолидации клеток и пластичности как целостной функции регуляции мозга:

- (а) влияние на синтез и высвобождение нейротрансмиттеров в зрелых и развивающихся нейронах;
- (б) стимуляция развития нейральных элементов; ретроградный транспорт медиаторов и белков;
- (в) регуляция активности ионных каналов и контроль LTP как основного механизма проведения импульса.

(2) Протективная функция: участие в механизмах защиты от окислительного стресса и апоптоза. Влияние на выживание клеток, поддержание их жизнеспособности.

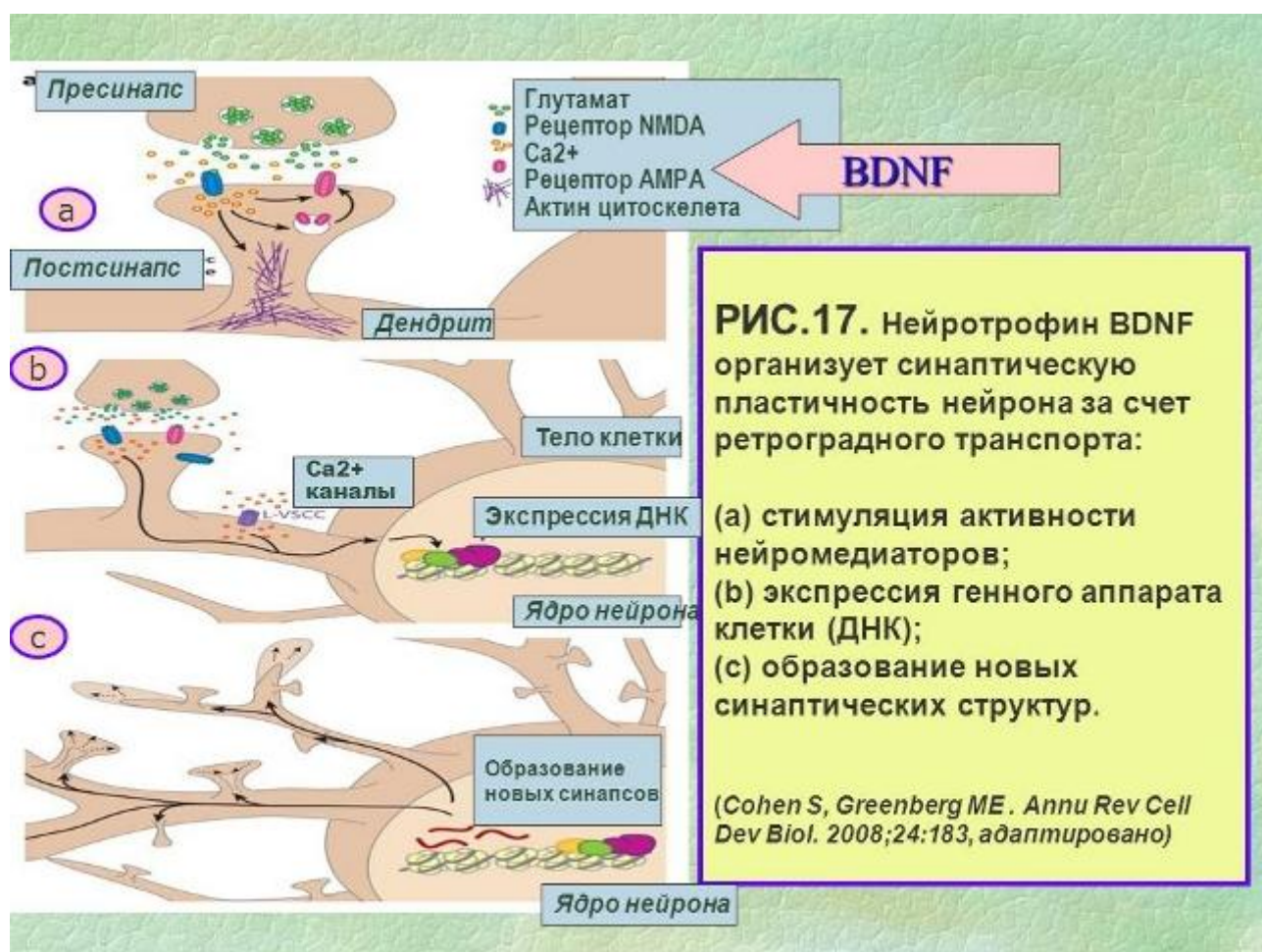
(3) Репаративная функция: стимуляция трансформации нейральных (прогениторных) стволовых клеток, как механизма заместительной репарации.

нейротрофинов как регуляторов пластичности мозга. Отметим особо, что именно эта основная характеристика нервной системы свидетельствует о возрастном статусе мозга, его устойчивости или, напротив, дизрегуляции при старении.

Распределение в мозге и синаптическая секреция нейротрофинов. Нейротрофины широко представлены в структурах мозга, проявляя, однако, некоторую специфичность распределения в субпопуляциях нейронов. Наивысший уровень потенциальной экспрессии нейротрофинов (мРНК NGF, мРНК NT-3 и мРНК BDNF) выявлен в гиппокампе мышей; экспрессия BDNF была в 50 раз выше, чем остальных нейротрофинов. В онтогенезе происходят колебания уровней нейротрофинов: резкое снижение исходно высокого уровня NT-3 и, напротив, увеличение BDNF. Нейротрофины секретируются в синапсах; установлено соотношение секреторных гранул в дендритах, где превалирующее содержание принадлежит BDNF и NT-3 и в меньшей степени - NT-4 и NGF. Для названных нейротрофинов выявлена их локализация в глутаматергических синапсах. BDNF активирует механизмы, регулирующие индукцию, поддержку ранней и поздней фаз долговременной потенциации мембраны (LTP – Long Term Potentiation) (Zhang HT, Li LY, Zhou XL, Song XB. *Immunochemical distribution of NGF, BDNF, NT-3, and NT-4 in adult rhesus monkey brains. J Histochem Cytochem* 2007;55(1):1-19)

Ретроградный транспорт нейротрофинов. Одной из важных сторон функции нейротрофинов оказывается участие в регуляции ретроградного транспорта медиаторов и белков в нейроне. Запускаемая с уровня лиганд-рецептор молекулярная цепочка проводит

дистантный сигнал от терминальной части аксона к телу нейрона. Инъекция меченого ^{125}I -NGF в гиппокамп или неокортекс прослеживается как ретроградный транспорт нейротрофина из терминалей холинергических клеток в тела нейронов базального переднего мозга. Установлено, что уровень NGF мРНК в различных отделах коррелирует со степенью холинергической иннервации переднего мозга. В ряде случаев нейрональная дегенерация, как следствие нарушения холинергической иннервации (медиаторный дефицит), связывается с нарушенным ретроградным транспортом нейротрофинов (РИС.17).



Существенной для понимания возрастных морфологических изменений мозга и образования tau белков и нейрофибриллярных сплетений играют нарушения *ретроградного аксонального транспорта*, связанные с BDNF. В физиологических условиях BDNF продуцируется в энторинальной коре и транспортируется от зоны CA3 в подушковидный мицелий к CA1 переднего мозга и амигдалы – следующей «станции» нейрофибриллярной дегенерации болезни Альцгеймера. Нарушение транспорта BDNF или подавление его продукции оказывается характерным для возрастного мозга и ведет к субклиническим эксцессам памяти и когнитивной функции (K. Schindowski, K Belarbi, and L Buée. *Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. Genes Brain Behav.* 2008;7(1):43–56).

4.2. Нейротрофины. Спектр функций, организующих работу мозга.

Пластичность. Нейропротекция. Защита от окислительного стресса. Нивелирование апоптоза. Участие в нейрогенезе.

ПЛАСТИЧНОСТЬ. Применительно к нервной системе – способность нервных элементов к адаптивной перестройке под влиянием внешних влияний, очаговых повреждений нервной ткани или под воздействием химических факторов. В условиях патологии нейропластичность обеспечивает компенсаторную (восстановительную) функцию мозга. Нейропластичность может проявляться как для отдельной клетки (потенциация, защита от повреждения, компенсация функций), так и на уровне интегративной деятельности мозга (адаптация, доминанта, мотивация, обучение). Структурные, физиологические и биохимические компоненты нейропластичности включают: изменение порога возбудимости потенциал-зависимых мембранных каналов клеток, медиаторную реорганизацию и изменение аффинности нейрональных рецепторов, изменения структуры и активности синапсов, формирование новых синапсов, изменения нейрональной конфигурации дендритов.

При характеристике нейротрофинов, как регуляторов синаптической пластичности, отмечается их значение для конструкции нейрональной сети – от образования цитоскелета клеток, новых синапсов, рецепторных образований (и т.д.) до структурного упорядочения взаимодействий отдельных нейронов или групп клеток. Нейротрофины участвуют в модуляции всех этапов “организации” нейрональной сети, включая участие в росте аксонов и дендритов, трафике мембранных рецепторов, высвобождении нейротрансмиттеров, образовании и функционировании синапсов. Нейротрофины контролируют выживание, дифференцировку и синаптогенез нервных клеток. Наиболее известный из нейротрофинов – BDNF участвует, например, в модулировании роста и ветвления дендритов, изменения плотности «шипикиков».

Следует выделить значение группы нейротрофинов (BDNF, NGF, NT-3 и -4/5) для регуляции нейротрансмиссии в зрелых и развивающихся синапсах. Транспортируемые в терминали из пост- и пресинаптических нейронов, эти факторы участвуют в регуляции нейрональной сети. Существенна роль нейротрофинов для контроля равновесия синаптических процессов в нервной системе. BDNF, например, осуществляет баланс возбуждающих (глутамат) и тормозных (ГАМК) медиаторных реакций в мозге. Нарушение этого соотношения, эксцессивный релизинг глутамата и развитие эксайтотоксичности является одной из исходных причин нейрональной патологии.

При рассмотрении механизмов, которые обеспечивают функциональную стабильность и синаптическую устойчивость нервной сети, важным оказывается взаимодействие медиатора глутамата и нейротрофинов. Это соотношение особенно значимо в условиях меняющихся факторов среды. Активация глутаматных рецепторов побуждает немедленную продукцию нейротрофинов. В дальнейшем нейротрофины активируют рецепторы пресинаптического региона, стимулируя экспрессию белков выживания, в частности антиапоптотический фактор Bcl-2 и антиоксидантные ферменты (**Mattson MP, Zhang Y, Bose S. /Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis, and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons deprived of glucose. Exp Neurol. 1993;121:1–13; Mattson MP, et al. / Neurotrophic factors attenuate glutamate-induced accumulation of peroxides, elevation of intracellular Ca²⁺ concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. J Neurochem. 1995;65:1740–51).** В

гиппокампе продуцирование нейротрофинов стимулируется через активацию глутаматных рецепторов в пределах всего нейронального сообщества, обеспечивая протекцию «взрослых» нейронов.

В структурах гиппокампа медиаторные процессы, связанные с функцией возбуждающих NMDA и AMPA рецепторов, оказываются значимыми для обеспечения синаптической устойчивости, реализуемой как «долговременная потенция» (LTP), базового процесса нейрональной электрической активности. Низкий уровень стимуляции LTP (с ограниченными амплитудой и частотой) могут привести, к долговременной депрессии синапсов, тогда как гиперстимуляция оказывается причиной синаптической дегенерации (пресловутая «эксайтотоксичность») (**Mattson MP. /Excitotoxic and excitoprotective mechanisms: abundant targets for the prevention and treatment of neurodegenerative disorders. Neuromolecular Med. 2003; 3:65–94).**

Стабильная долговременная потенция, как функция синаптической устойчивости, обеспечивает организацию процессов памяти и обучения. BDNF поддерживает уровень LTP в гиппокампе и зрительной коре; тогда как у мышей с пониженным синтезом BDNF выявляется нарушение LTP. Эти процессы находят непосредственное отражение в поведенческих тестах памяти и обучения (**Korte M, et al. Hippocampal long-term potentiation is impaired in mice lacking brain-derived neurotrophic factor. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92:8856–8860; Figurov A, et al. Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. Nature. 1996;381:706–709).**

Нейропротекция. В экспериментах было установлено, что нейротрофины снижают нейрональное повреждение при экспозиции к экзотоксинам, понижении уровня глюкозы в среде или ишемии. Регенерация нервных структур, промотируемая нейротрофинами, также была документирована во многих модельных исследованиях. Установлено, что экзогенное введение этих факторов обладает протективным действием и стимулирует регенерацию аксонов.

НЕЙРОПРОТЕКЦИЯ - естественная или терапевтическая стимуляция физиолого-биохимических механизмов, способствующих структурной и функциональной устойчивости мозга. В понятиях современной медицины нейропротекция, особенно в приложении к возрастным, ишемическим и нейродегенеративным заболеваниям, должна начинаться до развития клинической картины (идеология превентивной терапии).

Конкретизация этого понятия применительно к нейротрофинам включает:

- предотвращение дегенерации нейронов;
- стабилизацию цитоскелета;
- защиту клеток мозга от окислительного стресса и апоптоза;
- ослабление депозиции амилоидных образований;
- предотвращение медиаторного дефицита или дисбаланса нейротрансмиттерных процессов;
- стимуляцию нейрогенеза.

Для нейропротекции с участием нейротрофинов можно выделить два уровня экспрессии молекулярных и клеточных механизмов: (а) базовый – связанный с включением ДНК и активацией репаративных молекул; (б) исполнительский, связанный с реализацией репаративных молекул, стимуляцией процессов в цитозоле, мембране и рецепторах, затрагивающий в конечном плане морфологические элементы нервной ткани.

Особенность плеiotропного действия нейротрофинов состоит в возможности регулирующего влияния на этих уровнях.

Эти функции, прослеженные, например, для BDNF, указывают на увеличение синтеза белка в различных клеточных и тканевых регионах нервной ткани. С помощью мультидименсиональной технологии выявлено около ста различных белков, экспрессированных воздействием BDNF в синапсосах кортикальных нейронов мыши. Эти белки участвуют в образовании везикул, ремоделировании синаптических структур, а также в образовании некоторых рибосомальных белков, трансляционных факторов и тРНК синтетаз. Таким образом, нейротрофин увеличивает синтез синаптических белков и регуляторно поддерживает увеличение трансляционных процессов на уровне ядерного аппарата клеток мозга. За счет такого плеiotропного влияния обеспечивается реализация механизмов нейропротекции и синаптической пластичности (*Liao L, Pilotte J, Xu T, et al/. BDNF induces widespread changes in synaptic protein content and up-regulates components of the translation machinery: an analysis using high-throughput proteomics. J Proteome Res. 2007 Mar;6(3):1059-71).*

BDNF участвует в поддержании функций холинергических нейронов переднего мозга, организации процессов памяти, обучения, когнитивных функций. Нарушение холинергической иннервации побуждает экспрессию генов, участвующих в синтезе нейротрофических факторов выживания нейронов, ассоциируемых также со структурным ремоделированием нейрональной сети. Потеря части холинергических нейронов ведет к экспрессии генов воспалительного ответа и нейроапоптоза. Иммунохимическое исследование (cDNA macroarray and RT-PCR) показали, что у крыс с нарушением холинергической иннервации повышен синтез BDNF в срединной перегородке, дорсальном гиппокампе, фронтальной и энторинальной коре. Экспериментальные данные свидетельствуют, что у возрастных крыс отмечаются изменения в экспрессии генов, связанных с процессами воспаления, ферментов процессинга белков, окислительного стресса, роста нейронов/аксонов, белков цитоскелетного и экстрацеллюлярного ансамблей (*Paban V, Chambon C, Manrique C, et al/ Neurotrophic signaling molecules associated with cholinergic damage in young and aged rats: environmental enrichment as potential therapeutic agent. Neurobiol Aging. 2011 ;32(3):470-85).*

Включение трансляционных процессов и экспрессия механизмов синаптической пластичности, оркеструемой нейротрофинами, соответствуют специфичности нейрональной стимуляции в норме и патологии. Роль нейротрофических факторов видится здесь в двух ипостасях: (1) как регуляторов *медиаторных* процессов, связанных с непосредственной работой нейрона и (2) *репаративных* процессов, стимулирующих нейрогенез, образование новых клеточных структур, которые обеспечивают *усиление* или *замену* нейронального пула. В этом состоит приспособительное (адаптивное) значение синаптической пластичности, организуемой нейротрофическими факторами мозга, где физиологический и цитоморфологический аспекты рассматриваются в едином контексте.

Нейральное воспаление. Протективная роль нейротрофинов. Активация микро- и астроглии, наблюдаемая, как правило, при возрастных изменениях, травме мозга, токсических повреждениях, характеризуется как комплекс цитоморфологических проявлений с экспрессией провоспалительных цитокинов IL-1 α , IL-6, TNF- α . Нейродеструктивные заболевания (включая болезнь Альцгеймера) обнаруживают признаки нейровоспаления с включением системы комплемента, острофазных белков, пролиферативных гранул, а также провоспалительных цитокинов и хемокинов. В модельных экспериментах и на мозге человека установлено, что микроглия и астроциты

могут продуцировать амилоидный β -пептид ($A\beta$), один из основных компонентов сенильных отложений, который также является провокатором провоспалительных реакций, активирующих глию (**Farfara D, Lifshitz V, Frenkel D. Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. J Cell Mol Med 2008;12:762–780; Sondag CM, Dhawan G, Combs CK./ Beta amyloid oligomers and fibrils stimulate differential activation of primary microglia. J Neuroinflammation 2009; 6:1).**

При возрастной и/или деменциальной патологии отложение $A\beta$ запускает каскад молекулярных продуктов, участвующих в воспалительном ответе: интерлейкины ($IL-1\alpha$, $- \beta$; $IL-6$), $TNF-\alpha$, α -макроглобулин, белки комплемента, часть из которых локализуется вокруг амилоидной бляшки, активируя микроглию и астроциты.

Нейротрофический фактор мозга (BDNF) и нейротрофин-3 (NT-3) влияют на функцию клеток глии, снижая их провоспалительные реакции. На модели воспаления, вызываемого липополисахаридом, при активации микроглии выявлено участие провоспалительного цитокина интерлейкина $IL-1\beta$ и BDNF. Последний обнаружен также в макрофагах и Т-лимфоцитах мозга пациентов с рассеянным склерозом на ранних этапах формирования бляшек. В хронической фазе патологии число клеток, содержащих BDNF, резко снижено.

Рецепторы нейротрофинов (Trk-A, Trk-B, Trk-C) экспрессируются зрелыми лейкоцитами. При рассеянном склерозе выявлена активация рецептора $p75^{NTR}$ макрофагами и глиальными клетками. Стимулируемые нейротрофинами и ростовыми факторами компоненты воспалительного ответа входят в комплекс механизмов обеспечения нейропротекции и нейропластичности.

Таким образом, нейральное воспаление представляет собой комплексный патофизиологический процесс, в котором участвует значительное число сопряженных компонентов. Нейральное воспаление представляет часть большой клинической картины защитных или деструктивных процессов в мозге, развитие которых находится в прямой зависимости от динамики баланса (гомеостатического) многих систем химической регуляции. Роль нейротрофинов, как регуляторов нейропротекции (в предварительной или острой фазах процесса), представляется достаточно хорошо документированной.

Оценивая роль нейротрофинов в системе *антиоксидантной защиты* нервной ткани, следует выделить ряд фактов. В экспериментах на мышах установлена обратная корреляция уровней супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, каталазы и фактора роста нервов (NGF) в гиппокампе. После кортикальной травмы градуально экспрессируется содержание NGF (**DeKosky ST, Taffe KM, Abrahamson EE, Dixon CE. Time course analysis of hippocampal nerve growth factor and antioxidant enzyme activity following lateral controlled cortical impact brain injury in the rat. J Neurotrauma 2004;21(5):491-500).**

Ниже суммированы некоторые данные экспериментальных исследований, которые документируют участие нейротрофинов в антиоксидантной защите при различных видах нейронального поражения. Повреждение дорзальных корешков ганглиев спинного мозга нивелируется введением в перфузат NGF, вследствие чего стимулируется активность антиоксидантных компонентов – каталазы и глутатионпероксидазы (**Podratz JL, Windebank AJ. NGF rescues DRG neurons in vitro from oxidative damage produced by hemodialyzers. Neurotoxicology 2005;26(3):343-350).**

NGF предотвращает аккумуляцию АФК в дофаминергических клетках культуры PC12, подверженных воздействию 6-гидроксидофамина (модель болезни Паркинсона). Локальная аппликация BDNF в дорзальную зону поврежденного спинного мозга приводит к уменьшению образования липидных гидроперекисей, нивелированию воспалительных реакций и меньшему нарушению локомоторной функции у крыс (**Joosten EA, Houweling DA. Local acute application of BDNF in the lesioned spinal cord anti-inflammatory and anti-oxidant effects. Neuroreport. 2004;15(7):1163-6).**

Генетический дефицит BDNF ("нокаутные" мыши) сопровождался усилением эффекта этанольной токсичности, уменьшением уровня эндогенных антиоксидантов и антиапоптотического фактора Bcl-xl, а также деструкцией волокон Пуркинье в мозжечке неонатальных животных (*Heaton MB, Madorsky I, Paiva M, Mayer J. Influence of ethanol on neonatal cerebellum of BDNF gene-deleted animals: analyses of effects on Purkinje cells, apoptosis-related proteins, and endogenous antioxidants. J Neurobiol. 2002;51(2):160-76.*). Таким образом, нейротрофины оказываются важным промежуточным звеном в контроле антиоксидантной защиты.

Потребление диеты, содержащей низкий уровень антиоксидантного витамина Е, сопровождается сниженным синтезом BDNF. Добавление витамина Е в пищу нивелирует проявления окислительного стресса у крыс, нормализует уровень BDNF, синапсина 1 и сигнального фактора CREB, что способствует улучшению синаптической пластичности и когнитивной функции (*Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. Dietary omega-3 fatty acids normalize BDNF levels, reduce oxidative damage, and counteract learning disability after traumatic brain injury in rats. J Neurotrauma. 2004 Oct;21(10):1457-67.*).

Однако было также установлено, что факторы роста фибробластов (FGF1 или acidic FGF), экспрессируемые обычно в моторных нейронах, высвобождаются в повышенных количествах при окислительном стрессе. При этом наблюдается активация астроцитов, которая сопровождается апоптозом моторных нейронов спинного мозга. Эти явления связываются с возможным механизмом развития амиотрофического склероза, при котором окислительный стресс служит причиной дегенеративных изменений моторных клеток (*Cassina P, Pehar M, Vargas MR, et al/ Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem. 2005 Apr;93(1):38-46.*).

Большую роль в этих процессах играет расстройство внутриклеточного метаболизма Ca^{++} и функции ионных каналов, приводящее к апоптозу - программируемой гибели нейронов. Стимулируемый АФК выброс кальция ведет к гиперактивации глутаматных рецепторов и апоптозу, который является типичным для нейродегенеративных заболеваний.

Апоптоз. В период индивидуального развития организма образуется гораздо больше нейронов, чем может быть интегрировано в структуру мозга. Апоптоз, т.е. программируемая ликвидация определенной части клеток, оказывается неотъемлемой частью процесса онтогенеза. Признаки апоптотических нарушений выявлены в большом числе неврологических заболеваний. Феноменология ишемических и нейродегенеративных расстройств довольно точно соответствует современным представлениям об апоптозе. В здоровой ткани механизмы апоптоза пребывают под регулируемым генетическим контролем, и «программируемая уборка» клеток есть биологически необходимый процесс в эмбриогенезе или их естественной элиминации у взрослых особей.

Апоптоз реализуется как система специализированных биохимических реакций; при патологии ему предшествуют каскадно развивающиеся дизрегуляторные процессы в нервной клетке (ткани). Их перечень может быть последовательно представлен следующим образом.

(а) Нарушение энергообразующей функции митохондрий. Образование АФК, активирующих провоспалительные цитокины. Существенна на этом этапе роль фактора некроза опухоли (TNF- α): с ним связано открытие пор в митохондриях, последующий разрыв мембран и высвобождение цитохрома c и проапоптотических белков в цитозоль. Опосредованное оксидом азота (NO) повреждение митохондрий клеток мозга ведет к образованию супероксидных радикалов и к гибели наиболее уязвимых групп нервных клеток.

(б) Нарушения нейротрансмиссивных реакций: гиперактивация глутаматных рецепторов и гиперпродукция экзайтотоксических («возбуждающих») аминокислот. Инициация цитотоксичности глутаматом играет основную роль в патогенезе острой ишемии головного мозга, а также возрастных нейродеструктивных процессов.

(в) Общей, «типовой» реакцией апоптоза оказывается экспрессия генов проапоптотических белков (FAS, CCD95, p53 и др.), которой, однако, противостоит система антиапоптотических белков (Bcl-2 и др.). См. **РИС. 4.**

(г) Последовательная активация ферментов (каспаз и эндонуклеаз), приводящих к расщеплению белков ядерного матрикса, дестабилизации структуры хроматина, фрагментации ДНК, нарушению репликационной функции клетки.

В стадийности реакций апоптоза различают *обратимую* и *необратимую* фазы. Если обратимая фаза характеризуется активацией проапоптотических белков и каспазных ферментов (и на этом этапе возможна защита клетки), то вторая стадия характеризуется деструкцией молекул ДНК, морфологической дезинтеграцией и гибелью клетки.

Среди ведущих ферментов, причастных к разветвленной цепи апоптоза, значительное место принадлежит *каспазам*, цистеиновым ферментам, входящих в семейство 1бета-интерлейкин-конвертирующих протеаз. Экспрессия каспазы-3 была выявлена в нейронах, астроцитах и кровеносных сосудах у пациентов с патологией Альцгеймера; повышенная активность фермента в структурах мозга топографически ассоциировалась с нейрофибриллярными «клубками» и сенильными бляшками.

Оценивая роль ростовых факторов в сложной механике апоптоза, следует обратить внимание на их роль в провоцировании «программируемой гибели» нейрональных структур. Среди индукторов апоптоза - трансформирующий ростовой фактор (TGF- α/β) и фактор некроза опухоли (TNF- α). Однако среди факторов, препятствующих развитию апоптоза - фактор роста нервов (NGF), инсулиноподобный ростовой фактор (IGF-1/2) и фактор роста фибробластов (FGF). Выявлено иницирующее участие фактора некроза опухоли (TNF- α) в апоптозе глиальных и нейрональных клеток как следствие аутоиммунной патологии. Эти данные связываются с информацией об участии TNF- α в патологии рассеянного склероза.

При болезни Альцгеймера в мозге обнаруживается высокий уровень апоптотических молекул Вах, каспазы-3 и признаки фрагментации ДНК. Исследования на мозге человека установили, что каспазы и каспаза-обусловленное разрушение APP и tau белка облегчает продукцию бета-амиоида (A β) и образование нейрофибриллярных сплетений (**Du H, Guo L, Fang F, et al./Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. Nat Med. 2008; 14(10):1097-105**). В мозге пациентов с болезнью Паркинсона также выявляется значительное число пораженных апоптозом клеток (TUNEL-позитивные нейроны). Молекулы проапоптотического белка Вах аккумулируются в меланизированных клетках *pars compacta* черной субстанции. У таких пациентов обнаруживается повышенная активность каспазы-3 (**Mochizuki H, Goto K, Mori H, Mizuno Y. Histochemical detection of apoptosis in Parkinson's disease. J Neurol Sci. 1996 May;137(2):120-3**).

В экспериментах на модели болезни Паркинсона с вызванным MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) апоптозом в дофаминергических нейронах черной субстанции выявлен выход из митохондрий цитохрома c и активация каспаз (**Hartmann A, Troadec JD, Hunot S, et al./Caspase-8 is an effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, but pathway inhibition results in neuronal necrosis. J Neurosci. 2001;21(7):2247-55**).

Данные последнего периода представляют новые детали участия нейротрофинов в реакциях апоптоза. Выше (см. **РИС. 14**) были приведены данные о том, что предшественники пре-NGF или пре-BDNF обладают биохимической активностью. Было установлено, что взаимодействие пре-NGF с высокоаффинным рецептором p75^{NTR} служит триггером апоптоза – в противоположность антиапоптотическому эффекту самого NGF, взаимодействующего с низкоаффинным рецептором TrkB. Формулируется понятие «молекулярного переключателя сигнала» ("molecular signal switch"), которое относится к комплексу пре-NGF- p75^{NTR} – сортилин как новой «мишени» терапии сопряженных с механизмом апоптоза нейродегенеративных заболеваний (*Chen LW, Yung KK, Chan YS, et al./ The proNGF-p75NTR-sortilin signalling complex as new target for the therapeutic treatment of Parkinson's disease. CNS Neurol Disord Drug Targets. 2008;7(6):512-23*).

Аутофагия и нейротрофины. Аутофагия и апоптоз оказываются двумя звеньями цепи, устраняющей функционально негодные элементы клетки. Эти два механизма сопряжены с экспрессией сигнальных белков ERK, c-Jun N-концевой киназы и др., как следствие активации Trk – нейротрофиновых рецепторов. Сверхэкспрессия этих рецепторов снижает каталазную активность, ведет, соответственно, к массивному образованию гидроперекисей, что, в свою очередь, индуцирует активацию аутофагии (*Dadakhujiev S, Jung EJ, Noh HS, et al. Interplay between autophagy and apoptosis in TrkA-induced cell death. Autophagy. 2009;5(1):103-5*). На модели ишемии мозга, вызываемой окклюзией церебральной артерии, было установлено, что протективное действие глиального нейротрофина (GDNF) и фактора роста гепатоцитов (HGF) связано с включением антиапоптотического и антиаутофагального механизмов. Таким образом, эти два процесса, действующие «в связке», зависят от включения нейротрофической защиты и активации тирозинкиназных рецепторов (*Shang J, Deguchi K, Yamashita T, et al./ Antiapoptotic and antiautophagic effects of glial cell line-derived neurotrophic factor and hepatocyte growth factor after transient middle cerebral artery occlusion in rats. J Neurosci Res. 2010 Aug 1;88(10):2197-206*).

Участие нейротрофинов в нейрогенезе. Современные представления о нейрогенезе неотъемлемо связаны с исследованием нейральных стволовых клеток (НСК). Постулируется в качестве общего положения, что контролируемая трансформация НСК, включающая их миграцию, пролиферацию и дифференцировку, служит важным репаративным процессом в нервной системе. НСК рассматриваются как мультипотентные клетки, способные при определенных условиях трансформироваться в специализированные нейроны, астроциты, олигодендроциты. При посредстве сигналов нейротрофических факторов и внутриклеточных посредников контролируется превращение еще не специализированных НСК в адекватные данной ткани (специализированного участка мозга) клетки. Приобретаемая в процессе развития пространственная и временная специализация прогениторов сопряжена с изменением их реакции на различные нейротрофины и ростовые факторы.

Большой массив информации свидетельствует о роли экспрессируемых в мозге нейротрофических и ростовых факторов в регуляции трансформации НСК. С этой точки зрения обосновывается возможность новой стратегии терапии заболеваний ЦНС с использованием мобилизуемых эндогенных стволовых клеток и активирующей роли нейротрофических/ростовых факторов в этих процессах. Поиск в этом направлении представляется достаточно широким – от коррекции ишемических и травматических повреждений мозга до нейродегенеративной, а также нейропсихических расстройств, связанных с депрессией и аффективными состояниями.

Нейрогенез, включающий образование новых клеток в зрелом мозге, происходит в основном в субвентрикулярной зоне бокового желудочка и субгранулярной зоне зубчатой извилины. В экспериментах *in vivo* продемонстрировано, что инфузия BDNF в гиппокамп взрослых крыс стимулировала нейрогенез в зубчатой извилине; данные подтверждены наличием маркеров - BrdU(+)/Neu-N (**Scharfman H, Goodman J, Macleod A, Phani S, Antonelli C, Croll S. Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol.* 2005;192(2): 348-356).**

Во время нейрогенеза значительная часть возникающих в гиппокампе клеток подвержена апоптозу. Установлено, что прогениторные стволовые клетки оказываются значительно более уязвимыми к апоптозу, нежели «зрелые» нейроны. BDNF, синтез которого стимулируется в этот период, способствует выживанию новых нейронов.

Современные данные констатируют, что нейрогенез в ЦНС регулируется через нейротрансмиттерные рецепторы, которые экспрессируются нейротрофическими и ростовыми факторами. Особого интереса заслуживают данные о значении тирозинкиназных рецепторов и сопряженных с ними систем внутриклеточной сигнализации для реализации *вариантов* нейрогенеза. Нейротрофиновые рецепторы p75^{NTR} экспрессируются прогениторными клетками зубчатой извилины мышей и, соответственно, участвуют в пролиферации и дифференцировке НСК. У мышей с генетической недостаточностью p75(-/-) выявлено снижение нейрогенеза по его маркерным показателям (**Bernabeu RO, Longo FM. The p75 neurotrophin receptor is expressed by adult mouse dentate progenitor cells and regulates neuronal and non-neuronal cell genesis. *BMC Neurosci.* 2010 Oct 20;11:136).** Изоформы Trk-B и Trk-C экспрессируются в нейросферах нестин-позитивных клеток. BDNF, взаимодействующий с этими рецепторами, стимулировал дифференцировку НСК в различных пропорциях, включая активацию сигнальных белков, MAP-киназы, АКТ и STAT-3. Регуляция нейрогенеза зависела от суммации сигналов, экспрессируемых при взаимодействии нейротрофина с Trk-B тирозинкиназным рецептором (**Islam O, Loo TX, Heese K. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) has proliferative effects on neural stem cells through the truncated TRK-B receptor, MAP kinase, AKT, and STAT-3 signaling pathways. *Curr Neurovasc Res.* 2009;6(1):42-53).**

Данные свидетельствуют также о стимуляции нейрогенеза и трансформации нейральных стволовых клеток под действием эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF). Этот фактор стимулировал увеличение числа НСК; блокада связанной с рецептором VEGFR-2/Flk-1-киназной активности снижала экспансию таких клеток. VEGF, инъецированный в латеральный желудочек мозга в дозе, не вызывающей пролиферации эндотелия и изменения проницаемости сосудов, усиливал нейрогенез в стенке желудочков мозга, гиппокампе и ольфакторной зоне (**Schanzer A, Wachs FP, Wilhelm D, Acker T, Cooper-Kuhn C. et al. /Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol.* 2004;14(3):237-248).**

Данные последнего десятилетия показывают, что после ишемии мозга, при травматических повреждениях и нейродеструктивных процессах наблюдается активация нейрогенеза: новые нейрональные клетки обнаруживаются в местах повреждения, где они замещают часть дегенерировавших структур. Интрацеребральная инъекция VEGF на фоне ишемии мозга, вызываемой окклюзией церебральной артерии, уменьшала размеры инфарктной зоны, увеличивала выживаемость «молодых» нейронов в зубчатой фасции и субвентрикулярной зоне, а также стимулировала ангиогенез в ишемизированной зоне пенумбры полосатого тела. Устанавливается, таким образом, связь нейро- и

васкулогенеза при ишемии, стимулируемая VEGF (*Teramoto T, Qiu J, Plumier JC, Moskowitz MA. / EGF amplifies the replacement of parvalbumin-expressing striatal interneurons after ischemia. J Clin Invest. 2003;111 (8):1125-1132*).

Нейротрофины и ростовые факторы играют важную роль в феномене "прекондиционирования" ("предподготовки"), когда тренировка короткими ишемическими воздействиями защищает мозг от последующей тяжелой ишемии. В период 1-3 недель preconditionирования выявляется увеличение числа NeuN-позитивных нейронов, как показателя стимулированного нейрогенеза, которое совпадает с экспрессией мРНК ростовых нейротрофических факторов IGF-I, FGF2, TGFβ1, EGF и PDGF-A (*Naylor M, Bowen KK, Sailor KA, Dempsey RJ, Vemuganti R. / Preconditioning-induced ischemic tolerance stimulates growth factor expression and neurogenesis in adult rat hippocampus. Neurochem Int. 2005;47(8):565-572*).

Нейродегенеративные изменения в мозге ассоциируются со снижением уровня нейротрофических и ростовых факторов (FGF-2, IGF-1 and VEGF) в субгранулярной зоне зубчатой извилины и с заметным уменьшением пролиферативной активности. Результаты экспериментальных исследований, полученные на трансгенных животных, показали возможность коррекции сниженного нейрогенеза при болезни Альцгеймера с помощью нейротрофин-стимулирующих воздействий (*Brinton RD, Wang JM. Therapeutic potential of neurogenesis for prevention and recovery from Alzheimer's disease: allopregnanolone as a proof of concept neurogenic agent. Curr Alzheimer Res. 2006;3(3):185-90*).

Стимулируемая вирусным вектором трансдукция BDNF в нейральные стволовые клетки может служить перспективным подходом для компенсации патологических нарушений в мозге, связанных с ишемией, травмой, нейродегенерацией. Экспрессия BDNF регулирует выживание и дифференцировку НСК и обеспечивает их защиту от нейротоксичности, вызываемой в эксперименте триметилтином (*Casalbore P, Barone I, Felsani A, et al. Neural stem cells modified to express BDNF antagonize trimethyltin-induced neurotoxicity through PI3K/Akt and MAP kinase pathways. J Cell Physiol. 2010;224(3):710-721*).

Среди попыток терапевтического использования нейротрофинов для направленной регуляции нейрогенеза обращают внимание подходы, связанные с использованием современной генной технологии. Такие результаты были получены с VEGF, сочетание которого с нейральными стволовыми клетками приводило к 2-3-х кратному увеличению выживаемости нейронов после экспериментального геморрагического инсульта. Трансплантация в мозг комбинированных систем НСК и сверхэкспрессированного VEGF обеспечивала дифференцировку и выживаемость НСК человека и стимулировала ангиогенез и функциональное восстановление после поражения мозга (*Lee HJ, Kim KS, Park IH, Kim SU. Human neural stem cells over-expressing VEGF provide neuroprotection, angiogenesis and functional recovery in mouse stroke model. PLoS One. 2007;2(1):e156*). Позднее эти же авторы подтвердили возможность стимулирования нейрогенеза сверхэкспрессией нейротрофина BDNF на модели интрацеребральной геморрагии (*Lee HJ, Lim IJ, Lee MC, Kim SU. Human neural stem cells genetically modified to overexpress brain-derived neurotrophic factor promote functional recovery and neuroprotection in a mouse stroke model. J Neurosci Res. 2010;88(15):3282-94*).

На модели болезни Паркинсона (6-гидроксидофамин) использована конструкция прогениторных клеток и нейротрофина NT-3, которая вводилась крысам. В вентральной тегментальной области и ядрах презэнцефалона отмечалась усиленная дифференцировка клеток в дофаминергические нейроны, которые мигрировали к поврежденным зонам. При этом у животных наблюдались экспрессия тирозингидроксилазы и улучшение поведенческих тестов ротационной асимметрии (*Gu S, Huang H, Bi J, Yao Y, Wen T. / Combined treatment of neurotrophin-3 gene and neural stem cells is ameliorative to behavior recovery of Parkinson's disease rat model. Brain Res. 2009;1257:1-9*).

Можно резюмировать некоторые положения данной проблемы.

(1) Установлено, что различные виды патологического воздействия активируют нейрогенез в мозге. По-видимому, стимулом к усилению нейрогенеза в условиях патологии (равно как и при воздействии гипоксии, физической нагрузки, «обогащенной среды») оказываются измененные требования к функции мозга в целом, его метаболизма и функционального статуса.

(2) Одновременно такие активирующие нейрогенез воздействия сопровождаются экспрессией нейротрофических и ростовых факторов. Соединяя эти два обстоятельства, следует обратить внимание на то, что аппликация в желудочки мозга нейротрофического/ростового фактора усиливает, как правило, процессы нейрогенеза, экспрессию НСК и их миграцию в зоны поражения.

(3) Функциональное и структурное «напряжение» мозга требует своей защиты в виде продукции новых клеток. В этом состоит значение пластической репаративной роли нейрогенеза, реализуемой при участии эндогенных нейротрофинов. Спектр нейротрофических и ростовых факторов, причастных к регуляции нейрогенеза, оказывается довольно большим; для некоторых из них продемонстрирована кооперативность регуляторной функции, что обеспечивает вариабельность нейрогенеза.

(4) Представленная выше концепция об экспрессии стволовыми клетками рецепторов нейротрофинов позволяет с новых позиций представить проблему нейрогенеза в условиях патологических влияний. НСК оказываются «не просто» источником репаративного материала, мигрирующего в места пораженного мозга, но и стимуляторами активности нейротрофинов и ростовых факторов. То обстоятельство, что нейральные прогениторы могут экспрессировать активность $p75^{NTR}$ рецепторов указывает на возможность непосредственного включения сигнальных трансдукторных систем, обеспечивающих дифференцировку, выживание, защиту от апоптоза нейрональных структур.

(5) Оценивая в целом роль различных групп нейротрофических/ростовых факторов в условиях патологии, можно проследить некоторую специфичность их функций при стимулированном нейрогенезе, которая относится: (●) к типу патологии и (●●) к зоне мозга, где роль этих факторов нередко оказывается диаметрально противоположной.

4.3. Нейротрофины. Участие в ишемических и нейродегенеративных заболеваниях мозга. Возрастной аспект.

Старение мозга сопровождается постепенным снижением функции митохондрий, основной энергообразующей органеллы клетки. Нарушение баланса про- и антиоксидантных биохимических процессов ведет к нарастающему образованию АФК и, соответственно, индукции апоптоза. Классической формой нарастающей ишемии стареющего мозга оказывается дисциркуляторная энцефалопатия. Кровоснабжение регионов мозга слабеет, нейроны оказываются на голодном пайке, медиаторная система расстраивается. Физиологическим следствием этих внутриклеточных процессов оказывается нарушение межнейрональных связей, дисбаланс синапсов, невыполнение регуляторных функций, свойственных «нормальному» мозгу: развитие локомоторных расстройств, деменции, социальная адаптивная дезориентация организма. Возрастной мозг становится более уязвимым к ишемическим и нейродегенеративным влияниям. В данном разделе будут представлены данные относительно роли ведущих нейротрофических факторов при ишемических поражениях головного мозга, возрастных и деменциальных нарушениях, болезнях Альцгеймера и Паркинсона.

Ишемическая патология мозга. Большое число экспериментальных и клинических исследований позволяет с достаточной точностью проследить этапные биохимические сдвиги, возникающие при нарушении церебральной гемодинамики и ишемии мозга. Цепь процессов, составляющих нарушение нормального энергетического метаболизма клетки и ионного транспорта, нарушение синтеза структурных цитоскелетных и функциональных белков и, наоборот, активация деструктивного протеолиза (кальпаин, каспазы), дезорганизация работы систем сигнальных молекул составляют картину патохимических расстройств мозга, обусловленных его ишемией и реперфузией.

Положение о том, что медиаторы, физиологически активные пептиды, нейротрофины и ростовые факторы вовлечены в патологию ишемических и нейродегенеративных расстройств мозга приобрело в настоящее время множество доказательств. Большинство данных получено в результате экспериментальных исследований, на основании различных моделей острой и хронической ишемии головного мозга, с помощью современной иммуногистохимической техники и возможности селективного анализа активности нейротрофинов и их рецепторов. Эти исследования не могут в полной мере воспроизвести картину клинического уровня, однако экспериментальный подход дает ценную информацию, которая позволяет конкретно представить молекулярные и клеточные механизмы повреждения, рассматривать их в динамике дизрегуляторных процессов и на том основании строить стратегию терапевтического вмешательства с помощью нейротрофинов.

BDNF широко представлен в структурах ЦНС. Его мРНК идентифицирована в гиппокампе, амигдале, таламусе, пирамидных клетках неокортекса и в мозжечке. BDNF контролирует баланс глутаматергической и ГАМК-ергической систем. В одном из первых исследований этого направления было установлено, что изменения уровня BDNF в отделах переднего мозга после окклюзии средней артерии демонстрируют значительные вариации. На модельной ишемии, вызываемой окклюзией средней церебральной артерии, было выявлено: (а) последовательное снижение BDNF и рецептора TrkB, в инфарцированной зоне; (б) снижение BDNF-иммунореактивности в зоне пенумбры; эти явления наблюдались через 12 часов окклюзии; (в) сниженная иммунореактивность TrkB в астроцитах, окружающих зону инфаркта; (г) повышенную TrkB иммунореактивность в отдельных нейронах, дистантных от зоны инфаркта, в ипсилатеральной и контралатеральной структурах через 24 и 48 часов после начала ишемии (*Ferrer I, Krupinski J, Goutan E, et al. Brain-derived neurotrophic factor reduces cortical cell death by ischemia after middle cerebral artery occlusion in the rat. Acta Neuropathol. 200;101(3):229-38*). Определение уровня мРНК BDNF при умеренной (олигомической) ишемии мозга в отсутствие очевидных признаков нейронального нарушения показало его значительную (более 80%) экспрессию в гранулярных клетках гиппокампа уже через 6 часов окклюзии (*Schmidt-Kastner R, Truettner J, Lin B, Zhao W, Saul I, Busto R, Ginsberg MD. Transient changes of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) mRNA expression in hippocampus during moderate ischemia induced by chronic bilateral common carotid artery occlusions in the rat. Brain Res Mol Brain Res. 2001;92(1):157-166*).

Попытка нивелирования последствий церебральной ишемии в эксперименте с помощью BDNF продемонстрировала уменьшение размеров инфарктной зоны. Нейропротективный эффект был связан со снижением числа погибших нейронов; в то же время блокада активности BDNF стимулировала проявления церебральной ишемии (*Ferrer, I. et al. Brain-derived neurotrophic factor reduces cortical cell death by ischemia after middle cerebral artery occlusion in the rat. Acta Neuropathol. 101, 229–238 (2001); Larsson E, Nanobashvili A, Kokaia Z, Lindvall O. Evidence for neuroprotective effects of endogenous brain-derived neurotrophic factor after global forebrain ischemia in rats. J. Cereb. Blood Flow Metab. 1999; 19, 1220–1228*).

Внутривенное введение BDNF в течение 5 дней животным с фототромботическим повреждением коры мозга приводило к существенному защитному эффекту. Позитивное действие нейротрофина связывалось с его функцией как модулятора нейрогенеза в субвентрикулярной зоне и последующей миграции прогениторных клеток в ишемизированную зону (*Schäbitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, et al./ Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. Stroke. 2007;38 (7):2165-72*).

При внутрижелудочковом введении BDNF, наряду с уменьшением зоны поражения мозга, отмечалось уменьшение в ней числа апоптотизирующих клеток (*Takeshima Y, Nakamura M, Miyake H, et al. Neuroprotection with Intraventricular Brain-Derived Neurotrophic Factor in Rat Venous Occlusion Model. Neurosurgery. 2011 Feb 4. [Epub ahead of print]*).

Документирована роль астроцитов, секретирующих нейротрофин-3 (NT-3) при ишемии мозга. Супернатант экстракта микроглии, получаемый из ишемизированного мозга, содержал, помимо NT-3, глиальный нейротрофический фактор (GDNF) и трансформирующий ростовой фактор (TGF- β 1), которые обладали протективными свойствами. Число окружающих микроглию астроцитов и выживаемость клеток, подвергнутых ишемии, значительно возрастали при внесении в культуру нейронов супернатанта астроглиальных клеток (*Lin CH, Cheng FC, Lu YZ, Wang CH, Hsueh CM./ Protection of ischemic brain cells is dependent on astrocyte-derived growth factors and their receptors. Exp Neurol. 2006; 201(1):225-330*).

Нейротрофический фактор глиальных клеток (GDNF) распространен практически во всех регионах ЦНС и в спинном мозге. У крыс с окклюзионной ишемией мозга выявлялись повреждения, локализованные преимущественно в стриатуме, а также в теменной коре. Исследования обнаружили одновременное увеличение уровня мРНК GDNF в слое гранулярных клеток зубчатого ядра (*Arvidsson A, Kokaia Z, Airaksinen MS, et al. Stroke induces widespread changes of gene expression for glial cell line-derived neurotrophic factor family receptors in the adult rat brain. Neuroscience. 2001;106(1):27-41*).

Болезнь Альцгеймера (БА). Стадийное заболевание, которое характеризуется дисфункцией и гибелью холинергических ядер нейронов фронтальной коры и гиппокампа. Нейродегенеративные процессы при БА включают нарушение структуры и функций митохондрий, запуск окислительного стресса, но кроме того - измененный процессинг β -амилоидного белка-предшественника (APP) и аккумуляцию нейротоксической формы амилоидного β -пептида (A β). Исследования на экспериментальных моделях показали, что окислительный стресс и A β деструктируют работу нейрональных кальциевых каналов, провоцируя глутаматную экзайтотоксичность, изменения цитоскелета нейронов и образование нейрофибриллярных «клубков». Следствием этих процессов оказывается прогрессирующая потеря синаптических связей и собственно нейронов, которые первично развиваются в энторинальной коре мозга и гиппокампе. Функциональная деструкция характеризуется нарушениями памяти и поведенческих навыков, как первичных признаков деменции.

В ряду каскадных явлений, ведущих к развитию нейродегенеративных расстройств, важное место принадлежит процессам, связанным с пониженной перфузией церебральных сосудов. Концепция «критического порога церебральной гипоперфузии» рассматривает недостаточность мозгового кровообращения возрастной или органической природы в качестве исходной причины деменции Альцгеймеровского типа. Важная функция принадлежит здесь сосудистому фактору роста эндотелия (VEGF), регулятору ангиогенеза,

обладающему также нейротрофическими и нейропротективными свойствами. Региональные расстройства церебральной микрогемодинамики влекут функциональные изменения эндотелия с нарушением синтеза и релизинга NO. Получены доказательства, что базальный, или «тонусный» уровень NO является определяющим для повышенной реактивности эндотелиальных клеток к медиаторным, иммунным и нейрональным влияниям (*de la Torre JC, Stefano GB. Evidence that Alzheimer's disease is a microvascular disorder: the role of constitutive nitric oxide. Brain Res Brain Res Rev. 2000;34(3):119-36*). Помимо VEGF, на функцию микрососудов мозга при БА влияют белок ангиопоэтин и фермент тромбин. Последний, известный как ведущий фактор системы свертывания, играет роль нейротоксического компонента при БА. Присутствуя в микрососудах церебральной системы, тромбин становится источником окислительного стресса и пертурбаций сигнального каскада. Эти результаты были получены на постмортальном материале пациентов болезни Альцгеймера (*Yin X, Wright J, Wall T, Grammas P. Brain endothelial cells synthesize neurotoxic thrombin in Alzheimer's disease. Am J Pathol. 2010;176(4):1600-6*).

Большой массив данных свидетельствует о том, что синтез и процессинг амилоидного белка-предшественника сопряжен с изменениями экспрессии фактора роста нервов (NGF). Исследование NGF в сыворотке крови и в цереброспинальной жидкости выявило его пониженное содержание в стадии начальной деменции и, наоборот, повышенное у пациентов в активной фазе БА (*Schaub RT, Anders D, Golz G, et al./Serum nerve growth factor concentration and its role in the preclinical stage of dementia. Am J Psychiatry. 2002;159(7):1227-9*). Очевидно, содержание NGF отражает его аккумуляцию в мозге и может рассматриваться в качестве маркерного признака деменциальной патологии Альцгеймера.

На трансгенных мышах, моделирующих БА и экспрессирующих анти-NGF рекомбинантные антитела, выявлен комплекс признаков нейродегенеративной патологии. Этот комплекс включал: повышенное образование амилоидных бляшек, нерастворимых соединений tau белка, наличие нейрофибриллярных клубков в коре мозга и в гиппокампе. Трансгенные мыши с дефицитом NGF обнаруживали признаки холинергической недостаточности и гибели нейронов в кортикальных структурах; этим изменениям соответствовали существенные изменения поведенческих тестов (*Capsoni S, Ugolini G, Comparini A, et al./ Alzheimer-like neurodegeneration in aged antinerve growth factor transgenic mice. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97(12):6826-31*).

Некоторые данные сообщают об увеличении содержания пре-NGF в кортикальной и субкортикальной области мозга у субъектов с отсутствием клинически определяемых когнитивных нарушений и у пациентов с умеренными проявлениями БА (*Fahnestock M, Michalski B, Xu B, Coughlin MD. The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. Mol Cell Neurosci. 2001;18(2):210-20*). В продромальной и активной стадиях патологии уровень пре-NGF оказывался еще более высоким (в 1,4-1,6 раза). Этим результатам соответствовала обратная корреляция с характеристиками MMSE. Ранее отмечалось существенное различие биохимических характеристик «зрелого» NGF и его предшественника - пре NGF. Последний, связываясь с рецептором p75^{NTR}, стимулирует активность «домена смерти», провоцируя химический механизм апоптоза в нейрональных клетках.

Важной причиной нейродегенеративных расстройств служит, по-видимому, нарушение ретроградного транспорта нейротрофинов. NGF, обычно экспрессируемый в неокортексе и гиппокампе, транспортируется в тела холинергических клеток базальных ядер и срединной перегородки. Данные свидетельствуют о недостаточности ретроградного транспорта NGF при модельной патологии Альцгеймера из кортикального региона в

базальные ядра переднего мозга (*Blesch A. Neurotrophic factors in neurodegeneration. Brain Pathol. 2006;16(4):295-303*).

В экспериментальных исследованиях изучались изменения активности тирозинкиназных рецепторов, ключевых элементов реализации функции нейротрофинов. Белок Trk-B рецептора присутствует в амилоидных отложениях гиппокампа. В переднем мозге иммуногистохимическое исследование выявляет сниженный уровень экспрессии рецепторов Trk-A, Trk-B и Trk-C в базальных ядрах нейронов Мейнерта, что ассоциируется с редукцией протективного сигнала, исходящего от NGF (*Connor B, Young D, Lawlor P, et al./ Trk receptor alterations in Alzheimer's disease. Brain Res Mol Brain Res. 1996 ; 42(1):1-17 ; Boissiere F, Faucheux B, Ruberg M, et al./ Decreased TrkA gene expression in cholinergic neurons of the striatum and basal forebrain of patients with Alzheimer's disease. Exp Neurol.1997 ; 145(1):245-52*). На трансгенной модели БА у мышей было установлено, что нейтрализация активности NGF с помощью антител приводит к дисбалансу собственно NGF и пре-NGF и, соответственно, TrkA/p75^{NTR}, что ассоциируется с прогрессированием нейродегенерации (*Capsoni S, Tiveron C, Vignone D, et al. Dissecting the involvement of tropomyosin-related kinase A and p75 neurotrophin receptor signaling in NGF deficit-induced neurodegeneration. Proc Natl Acad Sci USA. 2010;107(27):12299-304*).

Выдвигается гипотеза, что рецептор p75^{NTR} играет провокативную роль в инициации связанных с БА процессов за счет повторного индуцирования клеточного цикла и соматической тетраплоидизации. Дупликация ДНК провоцируется рецептором p75^{NTR} при его связывании с эндогенным NGF. Напротив, BDNF тормозит G2/M развитие тетраплоидных клеток и предотвращает их апоптотическую гибель. Этот анализ был положен в основу новой гипотезы о том, что рецептор p75^{NTR} может быть триггером нейрональной тетраплоидизации при БА и, таким образом, служить мишенью терапевтического вмешательства (*Frade JM, López-Sánchez N. A novel hypothesis for Alzheimer disease based on neuronal tetraploidy induced by p75 (NTR). Cell Cycle. 2010;9(10):1934-41*).

Были предприняты попытки терапии симптомов деменции в клинике путем длительной (до 3-х месяцев) интравентрикулярной инфузии NGF. В другом исследовании больным ранней стадии БА вводился интрапаренхимально в базальное ядро мозга генетически модифицированный препарат NGF. Оба эти исследования показали некоторое улучшение когнитивных тестов, однако проявления побочных эффектов были слишком велики, чтобы эти подходы могли обрести терапевтическое применение (см. *Y.Levi et al./ Therapeutic Potential of Neurotrophic Factors in Neurodegenerative Diseases. Biodrugs 2005;19(2):97-127*).

Что касается других нейротрофинов, данные свидетельствуют, что BDNF также придается немаловажное значение как фактору, причастному к БА. Функция BDNF как эндогенного регулятора поддержания нейрональных функций, синаптической пластичности и структурной целостности выступает здесь на первый план. Определение концентрации BDNF в сыворотке крови и в цереброспинальной жидкости у 30 пациентов с различными стадиями БА выявило увеличение его содержания в начальной стадии заболевания, отражая активацию компенсаторных механизмов. По мере прогрессирования БА уровень BDNF снижался, коррелируя с критериями MMSE (*Laske C, Stransky E, Leyhe T, et al./ Stage-dependent BDNF serum concentrations in Alzheimer's disease. J Neural Transm. 2006;113(9):1217-24*). Отмечаются существенные различия в содержании нейротрофинов в различных отделах мозга у пациентов БА. Анализ постмортального материала показал, что содержание BDNF в гиппокампе, фронтальной и париетальной коре мозга существенно ниже, чем в контрольной группе сходного возраста, тогда как уровень NGF, наоборот, оказывается повышенным. Своеобразным контролем служат данные по содержанию нейротрофинов в мозжечке, где существенных изменений не обнаружено. Сниженный уровень BDNF при БА свидетельствует о нивелированной трофической поддержки нейрональной популяции,

включенной в базальные ядра холинергической системы переднего мозга (**Hock C, Heese K, Hulette C, et al. Region-specific neurotrophin imbalances in Alzheimer disease: decreased levels of brain-derived neurotrophic factor and increased levels of nerve growth factor in hippocampus and cortical areas. Arch Neurol. 2000;57(6):846-51.**

Определение мРНК BDNF на трансгенных моделях БА выявило сниженный уровень экспрессии нейротрофина и его отрицательную корреляцию с образованием больших амилоидных агрегатов в коре мозга и тяжестью заболевания (**Peng S, Garzon DJ, 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;29(29):9321-9.** Выявлено сниженное содержание мРНК BDNF в гиппокампе и энторинальной коре пациентов с БА. **Murer et al.** отмечали наличие BDNF-иммунореактивного материала, соответствующего сенильным амилоидным бляшкам, клетках энторинальной коры и других кортикальных структурах мозга (**цит. по Y.Levi et al./ Therapeutic Potential of Neurotrophic Factors in Neurodegenerative Diseases. Biodrugs 2005;19(2):97-127.**

В ТАБЛИЦЕ 3 приводятся результаты экспериментальной терапии БА с помощью препаратов BDNF.

ТАБЛ. 3. Нейропротекция клеток энторинальной коры нейротрофином BDNF на моделях патологии Альцгеймера (**по Nagahara AH, Tiszynski. Potential therapeutic uses of BDNF. Nature Rev Drug Discovery 2011;10:209; видоизменено**)

МОДЕЛЬ ПАТОЛОГИИ	Способ введения BDNF	Эффекты
APP-трансгенные мыши	Введение гена BDNF	Увеличение числа синаптических маркеров; улучшение памяти
Аппликация амилоида в культуру нейронов	Внесение в культуру BDNF	Предотвращение гибели клеток
Возрастные крысы	Инфузия BDNF	Нормализация экспрессии гена BDNF; улучшение памяти
Возрастные крысы; перфоративное повреждение	Введение гена BDNF	Увеличение размеров нейронов и их выживаемости.
Возрастные обезьяны; перфоративное повреждение	Введение гена BDNF	Увеличение размеров нейронов и их выживаемости.

Позитивные эффекты препаратов BDNF в отношении модельной БА, полученные на различных животных, включая приматов, свидетельствуют о возможности клинической коррекции проявлений БА.

4.4. Нейротрофины как регуляторный компонент программы старения.

Старение сопровождается комплексом молекулярных, клеточных, структурных и функциональных изменений мозга. Эти четыре уровня, описанные в предыдущих разделах, служат основой для понимания конкретных причин прогрессирующей структурной и функциональной дезинтеграции мозга. В общепринятом представлении для нейродегенеративных заболеваний, включая возрастные события, характерным оказывается ряд изменений, непреложно связанных между собой: дефицит холинергических медиаторов в структурах переднего мозга; экспрессия экзайтотоксических продуктов; мутации

предшественника амилоидного пептида или полиморфизм APO-E генов, которые ведут к образованию токсических амилоидов; отложение амилоидных бляшек и образование нейрофибриллярных сплетений; нарастающая потеря нейрональных и синаптических структур в гиппокампе и коре. Все эти процессы существенно влияют на стабильность нейрональных характеристик, включая синаптическую пластичность, а также процессы памяти, обучения, социальной ориентации. Болезнь Альцгеймера сопровождается дегенерацией холинергических нейронов переднего мозга, и этот процесс приводит к выраженным когнитивным расстройствам, особенно характерным для старения.

Нейротрофины как факторы регуляции и протекции, играют важную роль в процессах старения и в патогенезе сопровождающих старение заболеваний. На базовом уровне позиционируется роль нейротрофинов как факторов функционального баланса, регулирующих развитие, выживание, синаптическую пластичность нейрональных структур. Большое число доказательств свидетельствует об изменениях активности конкретных нейротрофинов и их рецепторов при возрастных изменениях в мозге, которые могут быть как факторами поддержания функционального баланса, так и инициаторами дезинтеграции, связанной с нейродегенеративными заболеваниями. С этих позиций нейротрофины рассматриваются как объекты новых терапевтических концепций, и предпринимаемые поиски в этом направлении имеют немало перспективных находок. «Нейротрофины как регуляторы процесса старения» - вот одна из линий этой парадигмы. Смещение медицинской позиции от ЛЕЧЕНИЯ к ПРЕДУПРЕЖДЕНИЮ возрастной патологии составляет её содержание.

Имеется много доказательств, что упражнения, когнитивная стимуляция мозга и ограничение в «энергонасыщенной диете» являются позитивными факторами среды, которые увеличивают продукцию BDNF и способствуют стимуляции нейрогенеза и стабилизации синаптической пластичности. В итоге длительного клинического исследования *K.Krabbe et al. (2009)* установили связь между содержанием BDNF в сыворотке крови и прогнозом долгожительства у людей. В выборке 1914 пациентов возраста до 85 лет при наблюдении в течение 50-58 месяцев констатировано, что низкий исходно и прогрессивно падающий уровень нейротрофина является маркерным признаком. В общем плане следует отметить, что в группе с низким уровнем BDNF больше снижены показатели когнитивных тестов, но увеличены признаки ожирения и диабета. Содержание BDNF в крови связывается с его противовоспалительной функцией: нарушение регуляторной роли нейротрофинов в процессах сосудистого (нейронального) воспаления ассоциируется с прогнозом смертности возрастных пациентов (*Krabbe KS, Mortensen EL, Avlund K, et al./ Brain-derived neurotrophic factor predicts mortality risk in older women. J Am Geriatr Soc. 2009;57(8):1447-52*). В клинических исследованиях 142 пациентов с помощью магниторезонансной томографии установлена корреляция между снижением объема гиппокампа и отрицательной динамикой содержания BDNF в сыворотке крови у возрастных индивидуумов. Эти результаты сравнивались с уровнем когнитивных функций и прогрессированием деменции (*Erikson KI, Prakash RS, Voss MW et al/ Brain-Derived Neurotrophic Factor is associated with age-related decline in hippocampal volume. J Neurosci 2010;30(15):5368-75*).

Экспериментальные данные представляют новые факты «патобиохимических» явлений, специфических для процессов старения. При сравнении первичных процессов образования нейротрофинов в мозге было установлено, что у возрастных крыс уровень пре-NGF и активности p75^{NTR} рецепторов оказываются существенно выше, чем для «зрелого» NGF и рецептора TrK-A. Результаты показали значительное превалирование

предшественника NGF в префронтальной коре и гиппокампе, что отражается в экспрессии белков сигнального каскада, промотирующих апоптоз и клеточную деградацию у возрастных особей. Функциональные различия между группами молодых и возрастных животных были подтверждены показателями поисковой активности и критериями когнитивного распознавания (**Terry AV, Kutiyawalla A, Pillai A. Age-dependent alterations in nerve growth factor (NGF)-related proteins, sortilin, and learning and memory in rats. *Physiol Behav.* 2011;102(2):149-57).**

Однако, уменьшение объема гиппокампа не является следствием только потери числа нейронов. Морфологические явления, ассоциированные с возрастом, включают уменьшение бранширования дендритов, также как и снижение плотности шипиков и волокон, проецируемых в гиппокамп. Кроме того, ослабление функции гиппокампа может быть связано с уменьшением нейрогенеза и трансформацией нейральных стволовых клеток в стареющем мозге. Поэтому следует полагать, что представляется недостаточным выделить единственный (морфологический) фактор, определяющий возрастные изменения. К числу важных причин относятся изменения экспрессии, читай, активности, нейромодуляторов и нейропептидов, своеобразных коннекторов разнообразных функций здорового и больного мозга. Кроме того, а, быть может, в первую очередь, следует отметить значение нейротрофинов, основных организаторов базовых функций мозга и гиппокампа, в частности. В этом контексте выделяется роль нейротрофического фактора BDNF, «критического компонента регуляции возрастных процессов в гиппокампе» (**Oliver von Bohlen und Halbach. Involvement of BDNF in Age-Dependent Alterations in the Hippocampus/Front Aging Neurosci. 2010; 2: 36**). Являясь фактором структурной организации нейрональной сети, BDNF, действуя через TrK-B рецепторы и соответствующие сигнальные белки, контролирует морфологию и медиаторную биохимию возрастного мозга. Дефицит активности нейротрофина обуславливает повышенную чувствительность клеток гиппокампа и нарастающие процессы биохимической и функциональной дезорганизации.

Вот несколько примеров. BDNF контролирует рост и выживание серотонинергических нейронов. У «старых» крыс, действуя через TrK-B рецепторы, BDNF способствует регенеративным процессам прорастания серотонинергических волокон_в условиях нейродегенеративных воздействий (**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;27:589–594**). На генетической модели дефицита нейротрофина (BDNF^{+/-}) выявлена связанная с возрастом гибель серотонин-содержащих аксонов (**Luellen BA, Bianco LE, Schneider LM, Andrews AM. Reduced brain-derived neurotrophic factor is associated with a loss of serotonergic innervation in the hippocampus of aging mice. *Genes Brain Behav.* 2007; 6: 482–490**).

BDNF модулирует активность норадренергической системы мозга: нейтрализация эндогенного нейротрофина с помощью специфических антител ведет к редукции норадренергических аксонов во фронтальной коре «старых» крыс (**Matsunaga W., Shirokawa T., Isobe K. (2004). BDNF is necessary for maintenance of noradrenergic innervations in the aged rat brain. *Neurobiol. Aging* 25, 341–348**).

Дофаминергическая система мозга также подвержена возрастным изменениям: установлено уменьшение число дофаминергических нейронов в клетках нигральной субстанции. Экспериментальное торможение экспрессии BDNF, также как блокада активации TrKB рецепторов приводит к дальнейшей потере дофаминергических клеток черной субстанции (**von Bohlen und Halbach O., Minichiello L., Unsicker K. (2005). Haploinsufficiency for trkB and trkC receptors induces cell loss and accumulation of alpha-synuclein in the substantia nigra. *FASEB J.* 19, 1740–1742**).

Ранее были представлены доказательства, что BDNF контролирует выживание и развитие *холинергических нейронов* переднего мозга, а также предотвращает их гибель при глутаматной интоксикации. У мышей с генетическим дефицитом нейротрофина (BDNF^{-/-}) отмечается ослабление холинергической иннервации и уменьшение числа холинергических нейронов в срединной перегородке мозга. Эти данные можно распространить на трактовку возрастных изменений, связанных с ослаблением синтеза и функции BDNF и, соответственно, прогрессированием нейродегенеративных заболеваний.

Исследование постмортального материала старых людей, страдавших БА, указывает на практическое отсутствие BDNF в микроглиальных клетках и в нейронах, содержавших нейрофибриллярные скопления, тогда как другие нейроны, не имевшие признаков массивной нейрофибриллярной дегенерации, обнаруживали иммунореактивный BDNF (**Murer MG, Boissiere F, Yan Q, et al./ An immunohistochemical study of the distribution of brain-derived neurotrophic factor in the adult human brain, with particular reference to Alzheimer's disease. *Neuroscience* 1999;88,1015–1032**). В другом постклиническом исследовании было установлено, что уровень иммунореактивного BDNF в поверхностных слоях коры мозга был существенно ниже у людей старше 80 лет. При этом tau-иммунореактивность клеток мозга оказывалась вдвое меньшей, чем у более молодых пациентов. Подобные изменения не были выявлены для другого нейротрофина – NGF (**Lorke DE, Wai MS, Liang Y, Yew DT. TUNEL and growth factor expression in the prefrontal cortex of Alzheimer patients over 80 years old. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2010; 23(1):13-23**).

Таким образом, возрастные изменения, как таковые, сопровождаются последовательным снижением содержания BDNF и развивающиеся на этом фоне возрастные заболевания, типа БА, включающие гиппокампальную атрофию и нейродегенеративную дисфункцию, могут также ассоциироваться с дефицитом нейротрофической защиты. Большой пласт современной научной информации свидетельствует, что нейротрофины являются ключевыми регуляторами не только выживания и развития клеток мозга, но также важны для когнитивных функций и сохранения памяти. Более того, последние исследования связывают уровень экспрессии нейротрофинов в зонах мозга и их содержание в сыворотке крови с эмоциональными и психо-соматическим статусом человека. Нейротрофины BDNF и NGF вовлечены в реакции стресса, тревожности и страха, депрессивных расстройств. Экспрессия этих нейротрофинов влияет на суточные и циркадные ритмы жизнедеятельности (**Cirulli F., and Alleva E. The NGF saga: From animal models of psychosocial stress to stress-related psychopathology. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 2009;30(3):379-395**). Выявлена корреляция между уровнем BDNF в сыворотке крови и аффективными моторными и когнитивными симптомами; с этих позиций BDNF может рассматриваться как неспецифический маркер психиатрических расстройств, характерных для нейродегенеративной патологии (**Teixeira AL, Barbosa IG, Diniz BS, et al./Circulating levels of brain-derived neurotrophic factor: correlation with mood, cognition and motor function. *Biomark Med.* 2010; 4(6): 871-87**). В целом, этот новый спектр активности нейротрофинов свидетельствует об их роли как эндокринных регуляторов высших функций организма, связанных с его физическим и ментальным статусом.

При тяжелых психосоматических состояниях (депрессия, фобии, стресс-обусловленный невроз) уровень BDNF в крови оказывается пониженным, при этом имеет место корреляция с тяжестью депрессивного расстройства. Мета-анализ большого контингента больных показывает, что сниженный уровень BDNF в крови у пациентов с депрессией заметно отличается от здоровых людей не имеет возрастных или гендерных отличий (**Sen S, Duman R, Sanacora G. Serum brain-derived neurotrophic factor, depression, and**

antidepressant medications: meta-analyses and implications. Biol Psychiatry. 2008 15;64(6):527-32).

Несомненно поэтому, что развитие неврологических и психосоматических расстройств, как спутников старения, сопряжено с изменениями активности нейротрофинов (в современных исследованиях первостепенное внимание уделено BDNF) – в строгой специфичности обстоятельств их действия (зоны мозга, рецепторные взаимосвязи, контроль «паразитарных» путей метаболизма нервных процессов и т.п.). С медицинской точки зрения нейротрофины могут рассматриваться как регуляторные компоненты программы старения и в этом их значение для сохранения социального статуса человека. Продолжением такого утверждения оказывается понимание нейротрофинов, согласно конкретным сведениям об их структуре и молекулярным и механизмам активности, как объектов терапевтического воздействия. Поиска на их основе их активности новых форм лекарственной терапии.

Обширная информация о реализации плеiotропных эффектов нейротрофинов через системы специализированных рецепторов и трансдукторных белков помогает оценить сегодняшним видением тезис Р.Леви-Монтальчини о замечательной роли нейротрофинов, как факторов организации и регуляции функций мозга в условиях нормы и патологии. Особенно значим по сути вывод первооткрывателя нейротрофинов: *«Вполне вероятно, что это свойство может модулироваться фармакологическими агентами, действующими по тому же пути, что и регуляция синтеза и рилинга NGF».*

К тому следует заметить, что в апреле 2011 года знаменитой итальянке исполнилось 102 года! (**РИС. 18**).



**РИС. 18.
Р.Леви-
Монтальчини
– 100 лет!**

«К счастью, у меня нет болезни Альцгеймера. И если я не ошибаюсь, мои мыслительные способности сейчас сильнее, чем когда мне было 20 лет. Потому что они обогатились большим опытом. И потому что ни мое любопытство, ни мое желание быть близким к тем, кто страдает, не уменьшились».

5. НЕЙРОПЕПТИДЫ.

- *Нейропептиды. Исходные представления.*
- *Нейропептиды и ишемическая патология мозга.*
- *Калликреин-кининовая система*
- *Ангиотензин II как детерминанта старения (Отголоски митохондриальной теории).*
- *Нейропептиды и нейродегенеративная патология мозга.*
- *Нейропептиды и нейротрофины: общее и различное в регуляции протективных механизмов.*

5.1. Нейропептиды. Исходные представления.

Нейропептиды – пептидные молекулы, включающие комбинации от 3-х до 40-50-ти аминокислотных последовательностей и относящиеся к большой группе регуляторных (физиологически активных) пептидов. В последние десятилетия представления о нейропептидах существенно изменились, чему послужила, с одной стороны, информация, уточняющая функции этих соединений, а с другой стороны – всё более определенные представления о нейротрофинах и нейротрофических ростовых факторах, перекрывающие первичную информацию о нейропептидах, как «универсальных регуляторах» функции мозга.

Как общую позицию можно постулировать, что нейропептиды и причисляемые к ним пептидные гормоны, осуществляют взаимодействие нервных клеток, согласованное с их медиаторным фенотипом, а также являются регуляторами эндокринных функций организма. Характеризуя различные группы нейропептидов, можно опираться на традиционную классификацию, составленную по признакам химической структуры вещества и спектра его функций (*«Нейрохимия» под ред. И.П.Ашмарина и П.В.Стукалова. М.1996; Гомазков О.А. «Мозг и нейропептиды. Справочно-информационное издание». М.1997*). Функции нейропептидов и пептидных гормонов как факторов эндокринной регуляции представлены в **ТАБЛИЦЕ 4.**

Нейропептиды исходно синтезируются как большие пептидные предшественники, именуемые пронеуропептидами или пронеурогормонами. Геном человека содержит около 90 генов, которые кодируют такие предшественники. Эти крупные пептидные молекулы с последовательностью в 150-200 аминокислотных остатков подвергаются ферментативному процессингу (поэтапному разрезанию молекулы). Образующиеся «зрелые» молекулы транспортируются по аксону внутри секреторных везикул к терминалям и высвобождаются в межклеточное пространство, достигая клеточных «мишеней» – синаптических рецепторов и/или органных систем. Выявлены различные типы протеаз, гидролизующих молекулу предшественника нейропептида.

ТАБЛИЦА 4. ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ И НЕЙРОГОРМОНОВ

Нейропептид/ нейрогормон	Регуляторная функция
Вазопрессин	Пептидный гормон гипоталамуса, транспортируется в гипофиз. Агонисты рецепторов вазопрессина стимулируют память. В. контролирует поведенческие реакции, связанные со стрессом. Регулирует АД.
Энкефалины (эндорфины, динарфины, орфанин /FQ/ и др.	Семейство опиоидных пептидов; анти-аналгезивная активность. Регуляция поведенческих актов.
Нейротензин	Классический нейротрансмиттер; влияет на нейрональный рилинг глутамата, индуцируя эксайтотоксичность.
альфа-Меланоцит-стимулирующий гормон	Пигментация кожи, стимуляция аппетита.
Кортиколиберины	Секреция АКТГ
Галанин	В коре мозга присутствуют галанинергические нейроны; Г. Участвует в регуляции синаптической пластичности при ишемии мозга.
Нейропептид Y	Ожирение. Артериальное давление
Соматостатин	Рост организма
Кальцитонин	Регуляция кальциевого обмена
Холецистокинин	Функции памяти. Регуляция аппетита.
РАСАР (пептид – активатор аденилатциклазы гипофиза)	Дифференцировка нейронов
Адреномедуллин (самый крупный из регуляторных пептидов, 52 а.к.)	Локальный вазодилататор,; стимулятор ростовых факторов. Секретируется из надпочечников с катехоламинами.
Грелин	Гормон голода; синтезируется жировой тканью; экспрессируется в гипоталамусе. Влияет на восприятие информации и памяти.
Брадикинин. Каллидин.	Регуляция АД, гипотензия, регуляция боли, проницаемости.
Мидкин	Плейотропный гепарин-связывающий цитокин, репаративные функции.
Ангиотензин-2	Регуляция АД, гипертензивный фактор; сильнейший прооксидант.
Эндотелин-1	Мощный вазоконстриктор, регуляция АД.
Натрийуретические пептиды (мозга, предсердия, пептид С	Регуляция работы миокарда, АД; функции почек.
Ингибитор меланоцит-стимулирующего гормона (MIF-I)	Пептид гипоталамуса, связующий мозг и гипофиз. Антагонист действия опиоидов.
Вещество Р	Обнаруживается в мозге и во многих тканях. Регуляция боли, АД; увеличивает капиллярную проницаемость. Антистрессорный фактор.

Цитохимические исследования выявляют большое разнообразие нейрональной фенотипии нейропептидов и пептидных гормонов. Классические нейротрансмиттеры, как правило, сосуществуют с нейропептидами, регулируя их функции.

Некоторые нейроны содержат несколько различных пептидов: вазопрессин сосуществует с динорфином и галанином в крупноклеточных нейронах супраоптического и паравентрикулярного ядер, а окситоцин - с энкефалином, динорфином, холецистокинином и «кокаин/амфетамин-регулируемым транскриптом» (CART) (*Hook V., Funkelstein L., Li D. et al. **Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2008; 48:393-423***).

5.2. Нейропептиды и ишемическая патология мозга

Как свидетельствует анализ литературы в базе данных PUBMED, подавляющая часть публикаций относится к экспериментальным исследованиям. Они носят разрозненный характер и описывают роль отдельных нейропептидов в модельной ишемии мозга:

- вазоинтестинальный пептид (VIP), сопряженный с активностью VEGF;
- брадикинин и его рецепторы, блокада которых уменьшает размеры инфарктной зоны;
- вещество P, фактор развития нейrogenного воспаления, отека, антиноцицептивных реакций;
- аргинин-вазопрессин через избирательную активацию V-1/2 рецепторов связан с вторичными проявлениями повреждения ткани при церебральной ишемии.

Интересной оказывается концепция «фармакологического прекодиционирования», т.е. применения вещества в малых дозах до возникновения патологического процесса. Ишемическое прекодиционирование служит элементом протективной стратегии ишемической патологии. Преишемическое цереброваскулярное введение агониста дельта1-опиоидных рецепторов энкефалина приводило к 60% стимуляции выживания CA1 нейронов после окклюзионной ишемии (*Charron C, Messier C, Plamondon H **Neuroprotection and functional recovery conferred by administration of kappa- and delta 1-opioid agonists in a rat model of global ischemia. Physiol Behav. 2008;93(3):502-11***).

Более развернуто эта концепция документирована в работе *Rehni* и соавторов (2008). В условиях пережатия церебральных артерий с последующей 24-часой реперфузией у мышей развивались признаки инфаркта мозга, которые сопровождались нарушениями ментальных и поведенческих реакций. Морфин, как агонист опиоидных рецепторов, и капсаицин, как рилизинг-фактор пептида CGRP (Calcitonin-gene related factor), вводимые за сутки до создания ишемии, существенно снижали как зону инфарктного поражения мозга, так и комплекс поведенческих реакций. Опыт контролировался дополнительным введением налоксона и суматриптана, блокирующих влияние на CGRP. Подобным образом позитивный эффект фармакологического прекодиционирования был обнаружен при ишемии миокарда с использованием агонистов опиоидов и CGRP (*Rehni AK, Singh TG, Jaggi AS, Singh N. **Pharmacological preconditioning of the brain: a possible interplay between opioid and calcitonin gene related peptide transduction systems. Pharmacol Rep. 2008;60(6):904-13***).

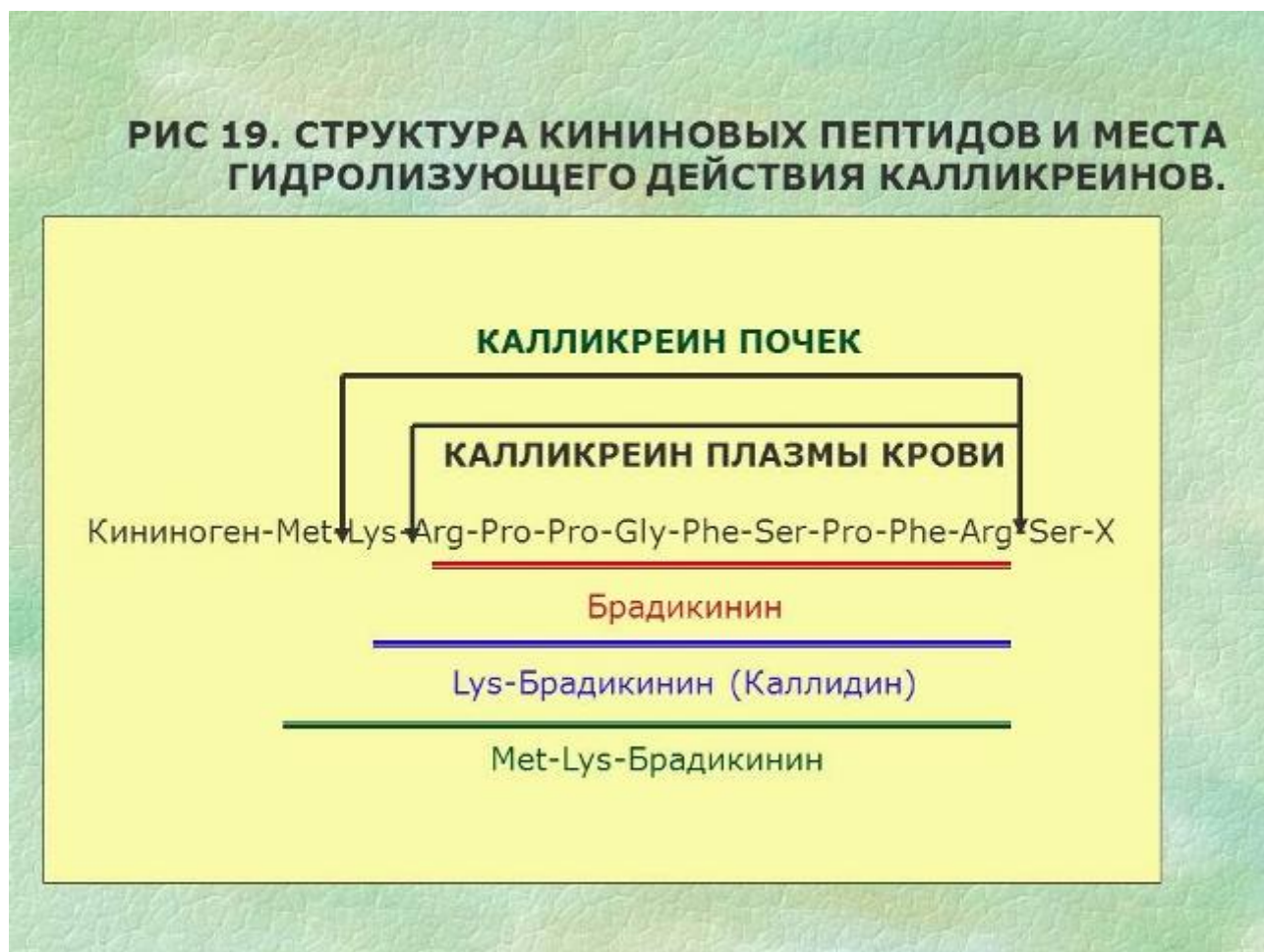
PACAP (Pituitary adenylate cyclase-activating peptide) – вещество со сложным названием: «Пептид, активирующий аденилатциклазу гипофиза»). PACAP расценивается как плеiotропный пептид, поскольку, подобно нейротрофинам, обладает большим спектром физиологической активности. Установлено, что этот пептид предупреждает гибель нейронов гиппокампа в условиях глобального или фокального ишемического поражения мозга. Этот эффект был выявлен на линиях мышей с пониженным или, наоборот, повышенным уровнем PACAP. В качестве причин протективного действия пептида рассматриваются три возможности: (а) ингибирование вызываемого ишемией апоптоза; (б) вовлечения в процесс интерлейкина-6; (в) экспрессия прогениторных стволовых клеток мозга, их дифференцировка в астроциты. Иммунореактивность рецептора PACAP была подтверждена в этих «новорожденных» клетках. Таким образом, есть возможность некоторого сравнения профиля активности PACAP и нейротрофинов. Быть может, к слову следует упомянуть, что структура PACAP, включающая в «готовой» форме включает 52 аминокислоты, выходит за рамки олигопептидов, обнаруживая сходство с ростовыми и нейротрофическими факторами. Стимулируемая им пострецепторная трансдукторная цепочка торможения апоптоза включает те же молекулярные компоненты: MAPK - JNK/SAPK - p38. PACAP участвует в нейропротекции ишемизированного мозга, и уменьшает деструкцию ДНК, вызываемую апоптозом. (*Shioda S, Ohtaki H, Nakamachi T, et al./ Pleiotropic functions of PACAP in the CNS: neuroprotection and neurodevelopment. Ann N Y Acad Sci. 2006;1070:550-60; Nakamachi T, Ohtaki H, Yofu S, et al./ Endogenous pituitary adenylate cyclase activating polypeptide is involved in suppression of edema in the ischemic brain. Acta Neurochir Suppl. 2010;106:43-6; Stetler AR, Gao Y., Zukin S. et al./ Apurinic/aprimidinic endonuclease APE1 is required for PACAP-induced neuroprotection against global cerebral ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(7): 3204–3209).*

5.3. Калликреин-кининовая система

История изучения и биохимическая структура калликреин-кининовой системы. История открытия и исследования калликреина, основного фермента кининовой системы, знаменует 100-летнюю дату, когда было обнаружено, что спиртовая вытяжка из мочи понижает артериальное давление у анестезированных собак (*Abelous JE, Bardier E. Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. CR Soc Biol 1909;66:511-20*). Спустя 20 лет было опубликовано исследование «нового гормона кровообращения», обнаруженного в моче человека. Новая субстанция обладала свойствами фермента и, будучи также выделенной из поджелудочной железы, получила название «Калликреин» (*Kraut H, Frey EK, Werle E. Der Nachweis eines Kreislaufhormon in der Pankreasdrüse. Hoppe-Seylers Z Physiol Chem 1930;189:97-106*).

60-70 годы прошлого столетия знаменуются большим интересом к исследованию кининов, брадикинина, в первую очередь. Выявляемые всё новые особенности его активности (фактор сосудистой вазодилатации, изменения проницаемости, ноцицепции, регуляции работы почек и др.) позволили говорить о «субстанции, которая может всё!»). Были выявлены связи кининов с функцией сосудистого эндотелия, активностью синтазы азота, открыты рецепторы. Калликреин (КК), относящийся к семейству химотрипсин-подобных ферментов, образуется в организме в виде нескольких изоформ, среди которых основное физиологическое и клиническое значение принадлежит тканевому КК и КК плазмы крови. Оба фермента являются факторами образования кининов. В качестве общей позиции считается, что в результате действия плазменного

КК образуется брадикинин, под действием тканевого КК – лизил-брадикинин, или каллидин (**РИС. 19**).



Плазменному КК, который образуется из прекалликреина под влиянием XII фактора свертывания крови (фактора Хагемана), придается большое значение как компоненту системы регуляции соотношения реологических свойств крови и тонуса сосудистой стенки («гемо-васкулярного гомеостаза»). Роль этой системы оказывается весьма значительной в патогенезе артериальной гипертензии, ишемической (коронарной) болезни сердца и при инфаркте миокарда. Значение этой системы, с акцентированием роли калликреина, было также подтверждено во многих ситуациях, связанных с нарушениями гемостаза, сосудистой проницаемости, кардиогенном шоке, физической нагрузке, патологии церебральных сосудов, и др. (*Дзизинский А.А., Гомазков О.А./ Кинины в физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы. Наука. Новосибирск, 1976, с 207*). (**РИС. 20**).

Тканевой, или glandularный, КК представляет собой кислый гликопротеид с молекулярным весом 40-43 кДа, включающим последовательность 258 аминокислотных остатков. Его наличие было идентифицировано в тканях поджелудочной железы, почек, селезенки, желудочно-кишечной и репродуктивной систем, надпочечниках, наконец, в мозге.

Помимо «вычленения» из кининогена каллидина, тканевой КК гидролизует другие предшественники, способствуя образованию в активной форме инсулина, ренина, атриального натрийуретического пептида, вазоактивного кишечного пептида, липопротеидов низкой плотности. Однако, несмотря на столь широкую палитру ферментной активности, тканевой КК преимущественно рассматривается как фактор

образования кининов, многогранное участие которых в большом комплексе патофизиологических процессов является хорошо доказанным.



Контроль активности тканевого КК в организме осуществляет «Калликреин-связывающий белок» каллистатин. Синтетический препарат каллистатин тормозит пролиферацию, миграцию и адгезию клеток сосудистого эндотелия *in vitro* и препятствует ангиогенезу на модели ишемии конечности (*Chao J, Miao RQ, Chen V, et al/ Noves Roles of Kallistatin, a specific Tissue Kallikrein Inhibitor, in Vascular Remodeling. Biological Chemistry. 2001;382(1):15-21*).

Кинины и старение. Установлено, что с возрастом уровень Т- и К-кининогенов - основных предшественников образования кининов, существенно увеличивается. У быстро стареющих крыс линии Fischer 344 содержание этих веществ в сыворотке крови разнится с молодыми животными в 6 раз. Соответственно, снижена чувствительность клеток эндотелия и к экзогенному брадикинину, т.е. речь идет о повреждении эндотелиальной функции сосудистого русла (*Pérez V, Velarde V, Acuña-Castillo C, et al/ Increased kinin levels and decreased responsiveness to kinins during aging. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2005;60(8):984-90*).

Отсюда следует вывод: у стареющего организма снижается реактивность сосудистого эндотелия по отношению к пептидным регуляторам; более того, имеет место постепенный разлад в системе «гемо-васкулярного гомеостаза», где, как отмечалось выше, задействованы компоненты системы фактора Хагемана (калликреин-кининовой, тромбиновой и фибринолитической систем гемодинамики). Связанное с возрастом

нарушение эндотелиальной функции является следствием нарастающих явлений окислительного стресса, образования гидроперекисей и дисбаланса регуляторных медиаторов эндотелиальной функции (оксида азота, кининов, тромбоксан/простагландина и др.).

Плейотропная функция калликреина и патология. Клинические и экспериментальные данные. Экспериментальные и клинические исследования выявляют большой спектр интересов, к которым имеет отношение калликреин. III Международный Симпозиум «Калликреин и калликреин-ассоциированные пептидазы», результаты которого были опубликованы в журнале *"Biological Chemistry"* (2010, Vol 391, №4), определил современные аспекты исследования калликреина применительно к задачам клинического назначения. В этом списке:

- Калликреин и другие пептидазы как сигнальные системы в онкологии.
- Калликреиновая система и диабетическая кардиомиопатия.
- Калликреин как мультифункциональная протеаза в мозге.
- Калликреин и родственные пептидазы: мостик между иммунной функцией и деградацией экстрацеллюлярного матрикса.
- Каллистатин, новый ингибитор тканевого Калликреина, в ремоделировании сосудов.
- Каллидиногеназа из почек и церебральное воспаление при экспериментальном инсульте.
- Калликреин и клиническая нейродегенеративная патология: калликреин как серологический маркер развития рассеянного склероза; снижение уровня тканевого КК у пациентов с болезнью Альцгеймера (постмортальные исследования).
- Ингибиторы тканевого калликреина и моноклональные антитела в диагностике легочной патологии.
- Рекомбинантный аденовирус-ассоциированный ген калликреина и защита от мишеней гипертензии; ингибирование апоптоза.

По-видимому, калликреин, как представитель *целостной системы*, куда входят его природные ингибиторы, физиологически активные продукты - брадикинин и каллидин, группы функционально сопряженных протеаз, участвуют в большом спектре функциональных аспектов жизнедеятельности, и теперь на новой витке интереса к этому ферменту, открываются клинические перспективы его применения. Имеются клинические данные о корреляции циркулирующего в крови тканевого КК и степени развития атеросклероза сосудов у пациентов с коронарной патологией. Этот маркер оказывается более точным коррелятом, чем другие факторы - эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF), основной фактор роста фибробластов (bTGF) и С-реактивный белок (**Porcu H., Emanuelli C., Desortes E. et al., /Circulating tissue kallikrein levels correlate with severity of carotid atherosclerosis. Artheroscler Thromb Vasc Biol. 2004; 24(6): 1104-10).** Природная недостаточность плазменного пре-КК ассоциируется с повышенным числом клинических осложнений в виде тромбоза или эмболии сосудов, инфаркта миокарда и ишемического инсульта (**Girolami A., Allemand E., Bertozzi I. et al./ Thrombotic events in patients with congenital prekallikrein deficiency: a critical evaluation of all reported cases. Acta Haematol. 2010; 123(4):210-4).**

Участие калликреин-кининовой системы в ишемической патологии мозга. Плазменный КК стимулирует активность микрососудов мозга и повышает потенциал антикоагулянтной и проангиогенной систем, индуцирующих защиту мозга (**Shariat-Madar Z,**

Mahdi F, Schmaier AH. /Assembly and activation of the plasma kallikrein/kinin system: a new interpretation. Int Immunopharmacol 2002;2:1841-1849; Xia CF, Yin H, Yao YY, et al. Kallikrein protects against ischemic stroke by inhibiting apoptosis and inflammation and promoting angiogenesis and neurogenesis. Hum Gene Ther 2006; 17: 206-219). Тканевой и плазменный калликреины и образующиеся под их действием кинины вовлекаются в события ишемического повреждения мозга; существенной оказывается потенциация нейральных элементов воспаления и вазодилатации, ведущие к развитию отека. При ишемическом инсульте брадикинин и каллидин образуются в повышенных количествах уже на ранних стадиях инцидента. На экспериментальных моделях было установлено, что уровень брадикинина достигает максимума в первые 12 часов ишемической/реперфузионной процедуры (**Groger M, Lebesgue D, Pruneau D, et al./ Release of bradykinin and expression of kinin B₂ receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. J Cereb Blood Flow Metab. 2005;25:978-89**). Из клинических наблюдений следует, что при ишемическом инсульте резко увеличивается активность другого кининового пептида – каллидина, которая сохраняется на этом уровне в течение первых суток заболевания (**Wagner S, Kalb P, Lukosava M, et al./ Activation of the tissue kallikrein-kinin system in stroke. J. Neurol. Sci. 2002;202:75-76**). Поскольку каллидин является основным продуктом ферментативного действия тканевого КК, его роль в начальной фазе ишемического/реперфузионного поражения мозга заслуживает особого внимания.

Протективная роль тканевого калликреина при острой ишемии мозга.

Серьезные доказательства протективной роли тканевого КК при острой ишемии мозга были представлены в экспериментальных исследованиях группы **Julian Chao**. С помощью микронасоса тканевой КК вводился интрацеребрально животным с окклюзионной ишемией. Инфузия препарата, начатая даже через 1 сутки после перевязки артерии, приводила к уменьшению размеров инфарктной зоны, нивелированию признаков глиального воспаления и заметной редукции локомоторного дефицита. При этом не отмечалось существенного влияния на уровень системного артериального давления.

Протективное действие калликреина было опосредовано активностью B₂ кининовых рецепторов, поскольку их блокада препаратом икатибант (icatibant) устраняла защиту. Другой вариант доказательства роли калликреина при острой ишемии был представлен с трансфером в мозг калликреинового гена, сопряженного с аденовирусом. Эта процедура приводила к снижению вызываемого ишемией апоптоза, увеличению миграции глиальных клеток в зону пенумбры, снижению локомоторного дефицита поведенческой активности (**Chao J, Chao L./ Experimental therapy with tissue kallikrein against cerebral ischemia. Frontiers in Bioscience 2006;11:1323-1327**).

Генный трансфер тканевого КК был использован в исследовании на препаратах нейронов коры мозга, подверженных ишемии-ацидозу in vitro. Защитное действие КК выглядело как снижение продукции молекул окислительного стресса, стабилизация мембранного потенциала митохондрий и торможение каспазы-3. Тканевой КК защищал клетки культуры кортикальных нейронов от острой токсичности, вызываемой глутаматом. Этот эффект, типичный для острой ишемии нейрональной ткани, сопряжен с торможением окислительного стресса, вызываемого повышенной продукцией оксида азота. Дополнительный анализ подтвердил, что эффект тканевого КК, препятствующий реализации глутаматной нейротоксичности, сопряжен с экспрессией B₂ кининовых рецепторов и, соответственно, включением внутриклеточной сигнальной (ERK1/2, NF-карраВ), стимуляцией активности нейротрофического фактора мозга BDNF и антиапоптотического белка Bcl2 (**Liu L, Zhang R, Liu K, Zhou H, et al./ Tissue kallikrein protects cortical**

neurons against in vitro ischemia-acidosis/reperfusion-induced injury through the ERK1/2 pathway. Exp Neurol. 2009 Oct;219(2):453-65.).

Дополнительным аргументом в пользу протективного действия тканевого КК при острой ишемии мозга послужили исследования, где была доказана нейрогенез-стимулирующая активность КК. Группа японских авторов, используя иммунофлуоресцентную технику, показала, что препарат очищенного тканевого КК потенцирует рост и дифференцировку нейральных стволовых клеток крысы. Прогениторные стволовые клетки были получены из стриатума эмбрионов крыс и суспендированы в особой культуральной среде. Внесение в эту среду КК приводило к стимуляции роста и дифференцировке нейральных стволовых клеток (**Kizuki K., Iwadate H., Ookubo R./Growth- stimulating effect of kallikrein on rat neural stem cells. II. Immunochemical analysis and specificity of the enzyme for neural stem cells. Yakugaki Zasshi 2007;127(5):919-22).** Эти важные исследования были продолжены группой китайских авторов, которые установили, что на фоне кортикального инфаркта (перевязка средней церебральной артерии) тканевой КК, вводимый в хвостовую вену, промотировал эндогенный нейрогенез с миграцией нейробластов в субвентрикулярную зону с последующей их дифференцировкой. Калликреин стимулировал появление специфических маркеров нейрогенеза BrdU(+)/DCX(+) и BrdU(+0)/нестин(+) в периинфарктном регионе мозга. Увеличение плотности маркеров отмечалось на 3-14 дни после воспроизведения ишемического инсульта мозга. Важно также заметить, что стимуляция нейрогенеза сопровождалась ангиогенезом, и оба эти процесса способствовали улучшению функционального статуса после терапии калликреином (**Ling L, Hou Q, Xing S, Yu J, Pei Z, Zeng J. / Exogenous kallikrein enhances neurogenesis and angiogenesis in the subventricular zone and the peri-infarction region and improves neurological function after focal cortical infarction in hypertensive rats. Brain Res. 2008 Apr 24;1206:89-97).**

Анализ протективного действия калликреина, фермента, участвующего в образовании кининов с реализацией физиологического ответа через взаимодействие с кининовыми рецепторами выявляет некоторые противоречия. Образующиеся под влиянием калликреина кинины, согласно распространенному мнению, должны бы усиливать провоспалительную активность этих пептидов. Роли кининов, как агентов, провоцирующих воспалительный ответ в различных тканях, посвящено немало исследований (см. **Couture RM, Harrison RM. Vianna AA & F Cloutier/ Kinin receptors in pain and inflammation. Eur J Pharmacol 2001; 429:161-76).**

Объяснение, которое приводят **J.Chan, L.Chan, (2006)** для разрешения этого противоречия, сводится к двум позициям: (1) количество локально продуцируемых кининов и (2) различная роль рецепторов, имеющих отношение к воспалению в острой или хронической фазе ишемического инцидента.

Можно полагать, что кинины отягощают нейрональное повреждение на ранней стадии, провоцируя развитие отека. Однако, на более поздней стадии процесса кинины обладают протективной активностью, как на то указывают последующие работы. Как свидетельствуют данные **(ТАБЛИЦА 5)**, инфузия калликреинового препарата в первый же день после начала ишемического инсульта редуцирует величину инфарктной зоны и снижает воспаление клеток в ишемизированной зоне мозга. Следовательно, важным оказывается определение времени «терапевтического окна», при котором удастся найти оптимальное время между повреждающей реакцией раннего провоспалительного ответа и стимуляцией протективных процессов защиты от окислительного стресса и воспаления.

ТАБЛ. 5. ВРЕМЕННЫЕ ОКНА ПРИМЕНЕНИЯ ТКАНЕВОГО КАЛЛИКРЕИНА ДЛЯ ТЕРАПИИ ОСТРОЙ ИШЕМИИ МОЗГА. Интрацеребральное введение гена КК или в/венное введение белкового препарата тканевого КК. Эксперименты на крысах с окклюзией средней мозговой артерии и последующей реперфузией (по J.Chan, L.Chan, 2006).

↓ - уменьшение; ↑ - увеличение, **н/о** – нет данных

ВВЕДЕНИЕ ПРЕПАРАТА	Интродукция гена тканевого КК	Интродукция гена тканевого КК	Интродукция гена тканевого КК	Инфузия тканевого КК
СРОКИ	-2 дня	8 часов	72 часа	24 часа
Размер инфаркта	↓	↓	↓	↓
Неврологический дефицит	↓	↓	н/о	↓
Апоптоз	↓	↓	↓	↓
Воспаление	н/о	↓	н/о	↓
Ангиогенез	н/о	↑	н/о	н/о
Нейрогенез	н/о	↑	н/о	н/о
Оксидативный стресс	↓	↓	↓	↓

Роль экспрессии B1 и B2 кининовых рецепторов. Противоречия во времени и типах развития острой ишемии мозга. Увеличение уровня брадикинина и каллидина при ишемии мозга ассоциируется с экспрессией B1 и B2 рецепторов. Эта экспрессия отмечается уже в первые 4 часа и сохраняется по крайней мере в течение 24 часов реперфузии. Существенно, что кининовые рецепторы B2-типа активируются преимущественно в нейронах, тогда как B1 рецепторы – в астроцитах пенумбры.

Значение B2 кининовых рецепторов в реализации протективного действия КК при ишемии мозга было подтверждено в экспериментах на мышах с генетическим нокаутом этих рецепторов. При наблюдении в период двух недель уровень смертности и неврологический дефицит после окклюзии средней мозговой артерии были у таких мышей существенно выше, чем в контроле. На 1-3 сутки у нокуатных мышей отмечалась большая площадь инфарктного поражения. Аккумуляция нейтрофилов в ишемизированной зоне B2-нокуатных животных оказалась также большей. Эти изменения коррелировали с пониженным уровнем оксида азота и других компонентов внутриклеточной сигнализации. На основании этих результатов был сделан вывод о позитивном вкладе экспрессии B2 кининовых рецепторов в защиту мозга при острой ишемии. Поскольку протективный эффект тканевого калликреина, как было продемонстрировано выше, сопряжен с образованием активных кининов и экспрессией B2 рецепторов, приведенные результаты

укрепляют доказательную базу возможности применения калликреина как терапевтического средства при острой ишемии мозга (*Xia CF, Smith RS Jr, Shen B. et al./ Postischemic brain injury is exacerbated in mice lacking the kinin B₂ receptor. Hypertension. 2006;47(4):752-61*). Однако ряд публикаций входят в противоречие с такой трактовкой. В ряде исследований, выполненных в США, Германии и Китае, Италии было установлено, что у мышей с нокаутом или фармакологической блокадой B1 или B2 кининовых рецепторов выявляются менее очевидные признаки ишемического поражения мозга. Размеры инфарктной зоны, неврологический дефицит и признаки апоптоза после ишемико-реперфузионного воздействия были у них выражены значительно меньше (*Groger M, Lebesgue D, Pruneau D, et al./ Release of bradykinin and expression of kinin B₂ receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. J Cereb Blood Flow Metab. 2005;25:978-89; Su J, Cui M, Tang Y, et al./ Blockade of bradykinin B₂ receptor more effectively reduces postischemic blood-brain barrier disruption and cytokines release than B₁receptor inhibition. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009, 388, 205-211; Raslan F., Schwarz T., Meuth SC. et al./ J Cereb Blood Flow Metab 2010; 30(8): 1477-86*). При этом отмечаются различия в результатах при блокаде B1 или B2 типов кининовых рецепторов (*Austinat M, Braeuning S, Pesquero J.B. et al./ Blockade of bradykinin receptor B₁ but not bradykinin receptor B₂ provides protection from cerebral infarction and brain edema. Stroke 2009, 40, 285-293*).

Анализируя эти противоречия, J.Chao и L. Chao (2006) констатируют, что B2 рецептор оказывается решающим в стимуляции воспалительной реакции на ранней стадии ишемического инсульта, однако оказывает протективное влияние на поздней стадии патогенеза. У животных с дефектом B2 рецепторов после церебральной ишемии смертность и постишемические паттерны выражены значительно больше (*Chao J, Chao L./ Experimental therapy with tissue kallikrein against cerebral ischemia. Frontiers in Bioscience 2006;11:1323-1327*).

Новые исследования вносят дополнение к высказанной позиции. Экспрессия B2 кининовых рецепторов относится к большому спектру тканей организма. Напротив, B1 кининовые рецепторы активируются преимущественно в ишемизированной ткани или как посредники воспалительной реакции. Оба типа рецепторов причастны к релизingu оксида азота, арахидоновой кислоты, простагландинов и лейкотриенов - соединений вариабельно (во времени, в ткани и по знаку) модулирующих воспалительные реакции клеток. Существенно, что оба типа рецепторов связаны с активацией изоформ NO-синтазы (NOS) в эндотелиальных клетках. Связанная с B2 кининовыми рецепторами активация eNOS оказывается, как правило, кратковременной (5 минут), тогда как экспрессия B1 кининовых рецепторов влечет пролонгированную активацию (до 90 минут) eNOS с продукцией оксида азота (*Kuhr F, Lowry J, Brovkovich V, Skidgel RA./Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B₁ and B₂ receptors. Neuropeptides 2010;44(2):145-54*).

Существенно также, что под влиянием тканевого или плазменного КК образуются каллидин или, соответственно, брадикинин – родственные пептиды, спектры фармакологической активности которых, однако, могут несколько отличаться.

Еще более существенный вклад в разрешение изложенных противоречий относительно про- или анти-ишемической роли B1 и B2 активности кининовых рецепторов вносит оставшаяся будто бы в стороне публикация Hecquest и соавторов. В модельных опытах было установлено, что B2 кининовые рецепторы непосредственно («в обход» образования брадикинина) активируются калликреином. Низкие концентрации тканевого и плазменного калликреина снижали на 80% связывание брадикинина с рецептором, стимулируя при этом мобилизацию Ca⁺⁺, синтез арахидоновой кислоты и др. (*Hecquet C, Tan F, Marcic BM, Erdös EG. / Human bradykinin B(2) receptor is activated by kallikrein and other serine proteases. Mol Pharmacol. 2000;58(4):828-36*).

Таким образом, «дуальная» функция калликреина в отношении кининовых рецепторов (синтез брадикинина – основного лиганда рецепторов и непосредственная активация этих рецепторов) позволяют полагать развитие РАЗЛИЧНЫХ молекулярных событий в ишемизированной ткани.

Более поздние работы подтвердили суть этой позиции. В исследовании *J.Chao и соавт. (2008)* было установлено, что тканевой калликреин защищал клетки миокарда крысы от острой коронарной ишемии. Эти опыты были выполнены на животных, лишенных кининогена и, следовательно, не образующих кинины, способные осуществлять свои эффекты через B2 рецепторы. Калликреин, вводимый через сутки после воспроизведения инфаркта миокарда, улучшал сократимость сердца, редуцировал зону ишемического поражения, нормализовал конечное диастолическое и систолическое давление в левом желудочке, как основные показатели нормализации (защиты) работы сердца.

В развитие этих положений о новой функции тканевого калликреина можно привести публикации, где было установлено, что тканевой калликреин вовлечен в кардиопротективный эффект блокаторов AT1 ангиотензиновых рецепторов в условиях экспериментальной ишемии/реперфузии, и это действие «обходится» без образования активных кининов. Блокада B2 кининовых рецепторов блокирует эти эффекты (**Messadi-Laribi E, V.Griol-Charhbili, A.Pizard, et al. /Tissue Kallikrein Is Involved in the Cardioprotective Effect of AT1-Receptor Blockade in Acute Myocardial Ischemia. J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007;323:210-216**). Наконец, следует отметить публикацию, где было показано, что калликреин активирует непосредственно B2 кининовые рецепторы, коррелятивно стимулируя при этом действие эналазилата, ингибитора ангиотензин-превращающего фермента (**Biyashev D, Tan F, Zhenlong Chen Zh, et al./ Kallikrein activates bradykinin B2 receptors in absence of kininogen Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2006 290: H1244-H1250**). Таким образом, сопоставление различных направлений экспериментальных работ, анализирующих непосредственное, не связанное с синтезом кининов, протективное действие КК, является важным для аргументации его использования как средства терапии острой церебральной ишемии и острой ишемии миокарда в клинике.

Подводя итог анализу этих работ, выполняемых на уровне современной экспериментальной патофизиологии, следует сделать заключение, что тканевой (почечный) КК обладает протективным действием при его применении в ранней фазе экспериментальной ишемии/реперфузии органа.

Исследования *M.Lemos и соавторов* анализируют роль B1 и B2 кининовых рецепторов в консолидации памяти у возрастных крыс, проецируя этот подход на патогенез болезни Альцгеймера. При сравнении крыс возраста от 3 до 18 месяцев с нокаутным дефицитом упомянутых кининовых рецепторов установлено, что экспрессия B1 рецепторов сопряжена с прогрессированием нейродегенерации и ухудшением тестов памяти. В то же время реакции, связанные с B2 кининовым рецептором, напротив, имеют нейротропное значение (**Lemos MT, Amaral FA, Dong KE, et al./ Role of kinin B1 and B2 receptors in memory consolidation during the aging process of mice. Neuropeptides. 2010;44(2):163-8**). В данном контексте существенны процессы, которые регулируются активацией B1 или B2 кининовых рецепторов. Следует предположить, что сигнальные реакции, «исходящие» от экспрессии того или иного рецептора, будут существенно различаться. Исследования на клеточных моделях болезни Альцгеймера связывают изменения аффинности B2 кининовых рецепторов с риском аккумуляции A β ₁₋₄₂ амилоидов, которые сопряжены с образованием Альцгеймеровских бляшек в структурах мозга (**Jong YJ, Dalemar LR, Sehra K. Bradykinin receptor**

modulation in cellular models of aging and Alzheimer's disease. Int Immunopharmacol. 2002;2(13-14):1833-40).

5.4. Ангиотензин II как детерминанта старения (отголоски митохондриальной теории).

Физиологически значимый пептид АНГИОТЕНЗИН является важным компонентом ренин-ангиотензиновой системы, которая участвует в контроле многих базовых функций организма и, в первую очередь, регуляции артериального давления крови. Активный пептид ангиотензин II (АII) образуется из ангиотензиногена в результате последовательного гидролиза пептидазами, наиболее значимой из которых оказывается ангиотензин-превращающий фермент (АПФ), дипептидилкарбоксипептидаза по своей субстратной специфичности. Нельзя не упомянуть, что этот фермент, ставший впоследствии основной мишенью действия множества препаратов (типа каптоприла, периндоприла, эналаприла, лизиноприла и др.), был открыт на Погодинской улице в Москве, в Институте биологической и медицинской химии, руководимом В.Н.Ореховичем (**Елисеева Ю.Е., Орехович В.Н., Павлихина Л.В., Алексеенко Л.П. Карбоксикапепсин – ключевой фермент двух систем, регулирующих кровяное давление. Вопросы мед химии 1970;(6):646-649.** Важно также отметить, что АПФ одновременно оказывается основным ферментом гидролиза брадикинина. То-есть, функция этой пептидазы подобна двойному повороту ключа на «включение» и «выключение» активности двух противоположно действующих пептидов – АII и брадикинина.

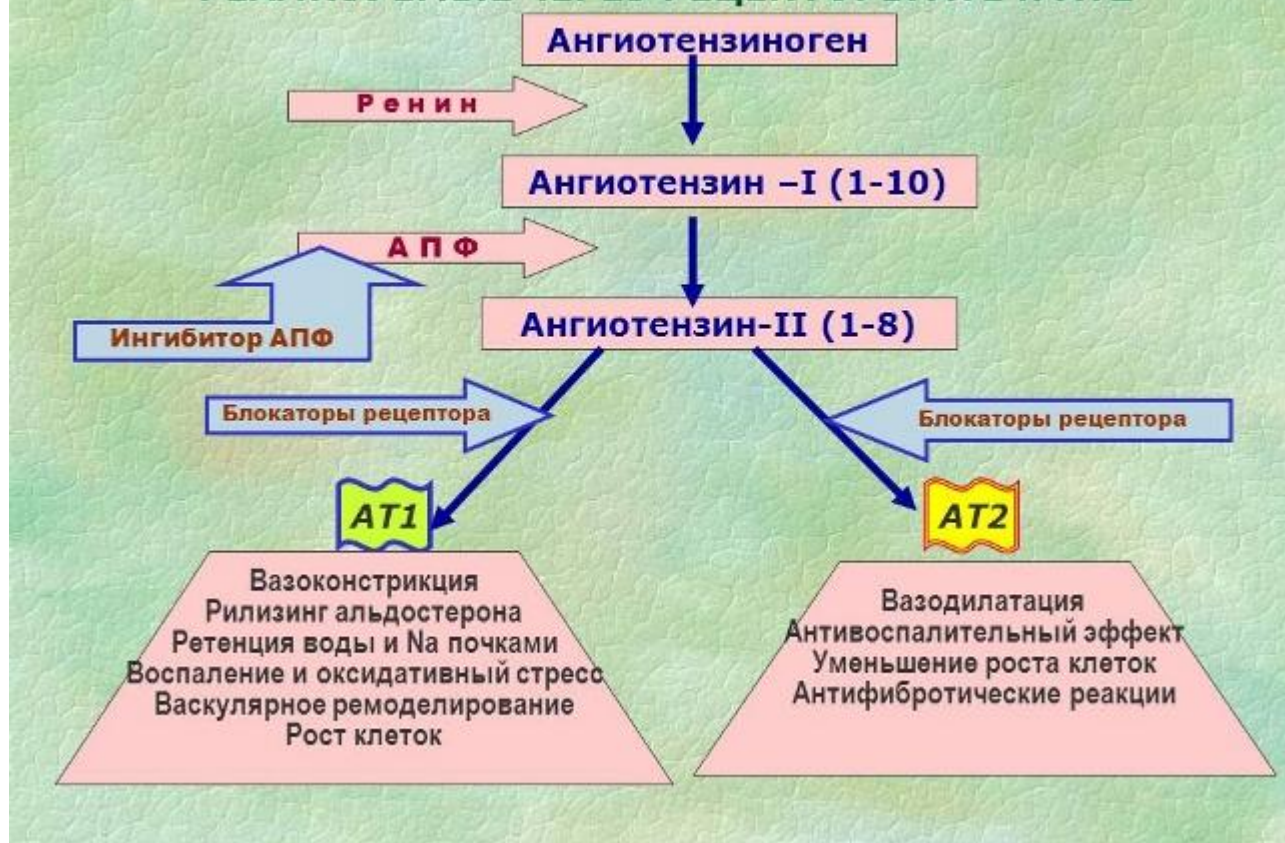
АII в первую очередь рассматривается как фактор повышения артериального давления крови (вазоконстрикторное действие), но также влияет на активность почечных канальцев, регулируя фильтрацию натрия и воды, и стимулирует релизинг альдостерона из надпочечников. Помимо эффективного вазоконстрикторного действия, для АII характерны пролиферативная, провоспалительная и профибротическая активность. Реализация разнородной активности АII осуществляется с участием специализированных рецепторов, которые фармакологически характеризуются как родопсина-подобные G-белок ассоциированные структуры, именуемые как рецепторы AT_1 и AT_2 типа. (**РИС. 21**). Процессы, реализуемые при участии этих рецепторов, оказываются противоположными, и это еще один пример фармакологической регуляции двойным поворотом одного механизма. Однако, по-видимому, ведущая роль в реализации сопряженных с АII физиологических процессов принадлежит рецептору AT_1 .

AT_1 рецептор клонируется в форме двух подтипов (AT_{1A} и AT_{1B}), первый из которых экспрессируется в почках, печени, кровеносных сосудах, надпочечниках и в мозге. При участии AT_{1A} рецептора осуществляется большинство «классических» эффектов АII в отношении контроля давления, высвобождения альдостерона и солевой ретенции в почках. В мозге AT_{1A} рецептор опосредует центральную стимуляцию симпатической нервной системы. Экспрессия другого подтипа - AT_{1B} по-видимому имеет отношение к функциям передней доли гипофиза и клубочковой зоны надпочечников.

Ангиотензин II и окислительный стресс. Многие данные свидетельствуют о вкладе ангиотензина II в процессы окислительного стресса, в первую очередь, за счет генерации супероксида и оксида азота. Образование этих молекул происходит под влиянием АII в цитозоле различных тканей, включая гладкомышечные и эндотелиальные клетки, а также фибробласты и клетки эпителия почечных канальцев. Выявлена роль АII в индукции воспалительных процессов с включением типичных компонентов – макрофагов, Т-клеток, мезангиальных клеток с активацией проадгезивных молекул. АII,

гиперпродукция которого имеет место при гипертензии, диабете, сердечной недостаточности, хронической патологии почек, ожирении, стимулирует образование в цитозоле и митохондриях активных форм кислорода. Ангиотензиноген и АПФ были выявлены во внутримитохондриальных структурах надпочечников крысы (*Erdmann B, Fuxe K, Ganten D. Subcellular localization of angiotensin II immunoreactivity in the rat cerebellar cortex. 1996 Hypertension 28:818–824; Peters J, Kranzlin B, Schaeffer S, et al./ Presence of renin within intramitochondrial dense bodies of the rat adrenal cortex. Am J Physiol 1996; 271:E439–E450*).

РИС. 21. МЕТАБОЛИЗМ АНГИОТЕНЗИНА II И ЕГО ЭФФЕКТЫ, РЕАЛИЗУЕМЫЕ ЧЕРЕЗ РЕЦЕПТОРЫ AT1 И AT2



В нормальных физиологических условиях способность AII провоцировать окислительный стресс строго контролируется. Однако в условиях повышенной активности ренин-ангиотензиновой системы, например, при старении организма, дисрегуляция AII ведет к увеличенному образованию АФК и апоптическому повреждению тканей. Гиперпродукция AII ведет к патологическим сдвигам в почках и сердце, документируется повышенным содержанием этого пептида в моче и в миокарде возрастных организмов (*Groban L, Pailes NA, Bennett CD, et al. Growth hormone replacement attenuates diastolic dysfunction and cardiac angiotensin II expression in senescent rats. J Gerontol A Biol Sci Med Sci 2006;61:28–35*). Образование гидроперекисей вследствие активности AII ведет к деструкции ДНК и, соответственно, ускоренному старению клеток. Согласно гипотезе, критическое повреждение ДНК, связанное с ангиотензином II и AT₁ рецепторами, приводит к остановке клеточного цикла, снижению пролиферации и преждевременному старению клеток в культуре гладкомышечных клеток (*Herbert KE, Mistry Y, Hastings R, et al. Angiotensin II-mediated oxidative DNA damage accelerates cellular senescence in cultured human vascular smooth muscle cells via telomere-dependent and –independent pathways. Circ Res 2008; 102:201–208*).

Комплекс этих данных позволил обосновать положение о роли системы АII в ускорении возрастного старения клеток и тканей. Логичным оказывается рассмотрение способов контроля (нивелирования) активности ренин-ангиотензиновой системы как формы предупреждения старения.

Старение и протективный эффект ингибиторов АII. Ингибиторы АПФ и блокаторы рецепторов АII широко распространены в практике лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Ингибиторы АПФ блокируют образование активного продукта – АII, а блокаторы его рецепторов препятствуют связи активного пептида с AT_1 рецепторами и нивелируют физиологическую активность АII. Такова общая канва ситуации, которая отражена на **РИС. 22.**



Экспериментальные исследования описывают антиоксидантный эффект при блокировании системы АII и, в первую очередь, защиту от митохондриальной деструкции. Ингибиторы АПФ увеличивали число митохондрий и предотвращали связанные со старением уменьшение митохондриального потенциала и нивелировали связанное с возрастом накопление продуктов перекисного окисления. Длительное применение ингибиторов АПФ или блокаторов AT_1 рецепторов защищало крыс от негативных эффектов старения сердечно-сосудистой системы и увеличивало общую продолжительность их жизни (*Basso N, Cini R, Pietrelli A, et al/ Protective effect of long-term angiotensin II inhibition. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007;293(3):H1351-8*). Хроническая терапия этими препаратами снижала возрастные изменения почек за счет защиты их митохондрий.

У стареющих организмов защита сердца и сосудов после блокирования АПФ сопровождается увеличением уровня оксида азота. Установлено, что ингибиторы АПФ – лозартан и эналаприл существенно увеличивают продукцию NO в гомогенатах сердца возрастных крыс (*Costa LE, La-Padula P, Lores-Arnaiz S, et al./ Long-term angiotensin II inhibition increases mitochondrial nitric oxide synthase and not antioxidant enzyme activities in rat heart. J Hypertens 2002; 20:2487– 2494*).

Возможность блокады определенных генов позволила получить дополнительные доказательства роли компонентов ангиотензиновой системы в нарушении функции митохондрий при старении организма. Исследования на мышах с генетическим дефектом AT₁ рецепторов показали меньшее нарушение функции эндотелия церебральных сосудов, которое характерно для возрастных животных. Мыши с нокаутом AT_{1A} рецепторов имели большую продолжительность естественной жизни, нежели их «дикие» сородичи при сохранении нормального веса тела, моторной координации и других поведенческих параметров. У таких мутантных мышей отмечались меньшие атеросклеротические изменения в аорте и морфологические изменения в миокарде, а также сниженное отложение интерстициального коллагена (*Benigni A, Corna D, Zoja C, et al./Disruption of the Ang II type 1 receptor promotes longevity in mice. J Clin Invest 2009; 119:524–530*).

Таким образом, базовым механизмом действия препаратов, ограничивающих активность ангиотензина II, является защита митохондрий от провоцируемого этим пептидом окислительного стресса. Этот клеточно-молекулярный механизм лежит в основе клеточно-молекулярных возрастных изменений, которые берут начало от постепенной «порчи» митохондрий и нарушения их энергопродуцирующей функции. Предлагаемый взгляд о протективном влиянии препаратов - блокаторов AT₁ рецепторов или ингибиторов АПФ для предупреждения старения и нивелирования возрастных нейродегенеративных заболеваний имеет достаточно оснований на базе клинических и экспериментальных исследований.

5.5. Нейропептиды и нейродегенеративная патология мозга.

Ангиотензин при болезни Альцгеймера. БА характеризуется прогрессирующим дефицитом когнитивной функции, ведущим к разрушительным изменениям личности. С нейропатологических позиций БА определяется накоплением молекул бета-амилоидного пептида (Aβ) в гиппокампе и коре мозга. БА относится к разряду так называемых «возрастных заболеваний»; её развитие может ассоциироваться с прогрессирующим увеличением артериального давления крови. Соответственно, период начального старения организма, связанный с гипертензией коррелирует с увеличенной тенденцией (риском) прогрессирования деменции.

Повышенная активность АПФ была обнаружена в гомогенатах постмортального материала пациентов с БА. Увеличенная иммунореактивность АПФ и АII установлена в нейрональных и периваскулярных структурах париетальной и фронтальной коры мозга. На мышах с трансгенным моделированием БА терапия блокаторов AT₁ рецепторов снижала характерные признаки нейропатологии БА, уменьшая агрегацию пептида Aβ во внеклеточных отложениях амилоидных бляшек. При этом уровень артериального давления заметно не менялся (*Miners JS, 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; 34: 181-193*).

Некоторые исследования демонстрируют протективное действие ингибиторов АПФ и блокатора рецептора АII в отношении когнитивной функции, независимо от антигипертензивного действия препаратов. Сравнение на когорте в 819 тысяч человек двух пар ингибиторов АПФ, проникающих (периндоприл, каптоприл) и не проникающих (эналаприл, имдаприл) через гематоэнцефалический барьер, показало преимущество первых для сохранения ментальных функций при болезни Альцгеймера. Еще более выразительный эффект отмечался при комбинации ингибиторов АПФ и блокаторов рецепторов АII (*Li NC, Lee A, Whitmer RA, et al. / Use of angiotensin receptor blockers and risk of dementia in a predominantly male population: prospective cohort analysis. BMJ 2010;340:b5465*).

Другие нейропептидазы при патологии мозга. Помимо АПФ в гидролизе физиологически значимых пептидов участвуют другие протеиназы с отличающейся субстратной специфичностью. Это означает, что построенная как комбинация аминокислотных последовательностей структура пептида может быть гидролизована на фрагменты, каждый из которых имеет самостоятельный профиль биологической активности. Одна из таких пептидаз – фермент неприлизин (NEP, neprilysin), цинк-содержащая металлоэндопептидаза, выделяемая как фактор деградации Аβ в мозге. Помимо серий экспериментальных работ, доказывающих связь неприлизина с трансформацией амилоидного пептида установлено, что у пациентов с БА активность этого фермента в мозге снижена. Неприлизин участвует в гидролизе таких нейропептидов как вещество Р, энкефалины и нейропептид Y. В отношении последнего на трансгенной модели БА было установлено, что образующиеся при гидролизе неприлизином фрагменты (NPY₂₁₋₃₆ и NPY₃₁₋₃₆) обладают нейропротективным действием (*см. Rose JB, Crews L, Rockenstein E. et al/Neuropeptide Y fragments derived from neprilysin processing are neuroprotective in a transgenic model of Alzheimer's disease. J Neurosci. 2009;29(4):1115-25*), Другой аспект проблемы связан с нейрогормоном соматостатином, в гидролизе которого также участвует неприлизин. При БА и при старении организма уровень соматостатина и экспрессия его рецепторов заметно снижены. Внутривентрикулярная инъекция пептида Аβ₂₅₋₃₅ приводила к снижению иммунореактивности соматостатина и его рецептора в височной коре мозга. Одновременно констатирована сниженная активность неприлизина, контролирующего содержание соматостатина в мозге (*Burgos-Ramos E, Hervás-Aguilar A, Aguado-Llera D, et al/ Somatostatin and Alzheimer's disease. Mol Cell Endocrinol. 2008;286(1-2):104-11*). Таким образом, в цепочку патогенеза БА, помимо АПФ и связанных с ним пептидов – ангиотензина и соматостатина, а также их рецепторов, следует включить некоторые другие пептидгидролазы. Модуляция их активности оказывается предметом интереса клинической фармакологии и тактики терапии возрастных нейродегенеративных заболеваний.

5.6. Нейропептиды и нейротрофины: общее и различное в регуляции протективных механизмов.

Сравнение данных об участии в патологии мозга нейропептидов и нейротрофинов выявляет существенные различия. Роль нейропептидов, как регуляторов трансмиссивных процессов, отражается в нарушениях межнейронных связей, которые затрагивают картины поражения мозга, связанного с ишемией, нейродегенеративной патологией, черепно-мозговой травмой. В ряде случаев вовлеченность нейропептидов в патологический процесс проявляется в изменениях проницаемости (развитие отека) или ноцицептивных реакций. Присущая основным нейротрофинам плейотропная активность, затрагивающая большой спектр жизнедеятельности клеток – от дисфункции митохондрий, включения генов выживания и нейрогенеза – не имеет столь выраженных примеров для нейропептидов.

Второй аспект этой проблемы – функциональная сопряженность отдельных нейротрофинов и нейропептидов. В культуре кортикальных нейронов нейротрофины BDNF и NT-3 заметно увеличивали уровень нейропептида Y и соматостатина, а также вещества P (*Carnahan J, Nawa H. Regulation of neuropeptide expression in the brain by neurotrophins. Potential role in vivo. Mol Neurobiol 1995;10(2-3):135-49*). В свою очередь, как было установлено в экспериментах in vivo, NPY снижал содержание BDNF и, напротив, увеличивал уровень NGF в гипоталамусе крыс. Эти эффекты ассоциируются с регуляцией антагонистических отношений в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой «оси» при стресс-обусловленных (анксиогенных и депрессивных) расстройствах (*Gelfo F, De Bartolo P, Tirassa P, et al./ Intraperitoneal injection of neuropeptide Y (NPY) alters neurotrophin rat hypothalamic levels: implications for NPY potential role in stress-related disorders. Peptides. 2011 Apr 4. [Epub ahead of print]*).

Третий аспект – попытка понять спектры активности нейротрофинов и нейропептидов на уровне лиганд-рецепторных отношений. Суть, как нам кажется в первом приближении, – во взаимодействии с «особенными», тирозинкиназными рецепторами, через которые осуществляется специфическая «разводка» сигнальных процессов, контролирующей большой спектр жизнедеятельности клетки. Если для любого из рассмотренных нейропептидов специфическим оказывается наличие «его» особенного рецептора или нескольких изоформ рецептора (брадикинин – B1, B2; ангиотензин – AT_{1A}, AT_{1B}, AT₂ и др.; нейропептид Y – Y1-6 и т.д.), то для множества нейротрофинов и ростовых нейротрофических факторов констатируется ограниченный спектр тирозинкиназных рецептирующих структур. В то же время вариабельность сигнальных экспрессий, исходящих от контакта «нейротрофин-рецептор» оказывается достаточно большой и, кроме того, регулируемой дополнительными «белками-согледателями», типа сортина. (См. раздел 1). Потому «рабочий» биохимический потенциал нейротрофинов оказывается много более значимым для регуляции базовых функций клеток нервной системы: про- или антиокислительная и апоптотическая активность, выживание клеток, их дифференцировка, поддержание долговременной нейрональной потенциации (LTP), организация синаптической пластичности. В последние годы всё больше исследований посвящено роли нейротрофинов при эндогенно стимулируемом нейрогенезе; число работ по нейропептидам здесь невелико.

Остается загадочной закономерность между размером лиганда (количество аминокислотных остатков), который связывается с рецептором, и спектром активируемых биологических процессов. В отношении нейротрофинов, в структуре которых насчитывается от 100 до 250 аминокислотных остатков, подсказкой оказываются изначальные исследования NGF и BDNF, где были выявлены ограниченные пептидные «мотивы», избранные сочетания аминокислот, ответственных за контроль различных процессов в клетке.

Эта идея послужила основанием для разработки концепции терапии «мини-пептидами», или «тирозинкиназной терапии», приобретающей всё более доказательных аргументов.

6. «МИНИПЕПТИДЫ» И КОНЦЕПЦИЯ НЕЙРОТРОФИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ.

- Поиск нейротрофических пептидомиметиков.
- Стратегия «малых пептидов» как направление поиска новых продуктов с нейротрофической активностью.

В предшествующих главах последовательно утверждалось положение, что нейротрофины и ростовые факторы относятся к физиологически значимым пептидам,

которые на клеточном уровне регулируют большой спектр процессов в здоровом, больном, стареющем мозге. В этот перечень входит контроль роста и дифференцировки нейронов в развивающихся и переживающих системах, функциональная стабильность и пластичность нейрональных процессов, промотирование нейрогенеза. В зрелом мозге эти факторы защищают чувствительные нейрональные структуры от повреждения. Среди многих химических регуляторов нейротрофинам принадлежит особая роль в защите и репарации мозга при ишемических, нейродегенеративных и травматических повреждениях. Это положение базируется на информации об особом регионарном синтезе нейротрофинов в мозге, доставкой по аксонам в соседние регионы и колокализации сопряженных с их эффектами рецепторов.

Фармакологический эффект нейротрофинов лимитируется их прохождением через гематоэнцефалический барьер. Крупные полипептидные молекулы подвергаются также быстрому гидролизу ферментами, присутствующими в крови. Попытки в экспериментальных работах использовать эффекты нейротрофинов и ростовых факторов путем непосредственного введения из в желудочки мозга не получило развития в клинике. Концепция «нейротрофической терапии» в значительной мере остается декларативным постулатом. Хотя следует оговориться, что в ряде случаев не без успеха используются в клинике препараты, представляющие короткие наборы естественных пептидных фрагментов (семакс, церебролизин, кортексин, ноопепт).

В последнее десятилетие активно разрабатывается терапевтическая стратегия с использованием «минипептидов» - соединений, способных связываться с p75^{NTR} и Trk-рецепторами и реализующих элементы нейротрофической активности. Такой подход сулит преимущества в лечении, воспроизводя протективные эффекты нейротрофинов или направленно влияя на активность рецептора. Речь может идти о веществах, которые, не будучи собственно нейротрофинами, но, специфически взаимодействуя с нейротрофическими рецепторами, стимулируют синтез и релизинг других активных факторов в соответствующих регионах мозга.

Предпосылки к пониманию особенности эффектов нейротрофинов были приведены в разделе 4.1. «Рецепторы нейротрофинов». Исследования, основанные на современной рентгеноструктурной технике в сочетании с фармакотестированием, выявили участки нейротрофинов, ответственные за реализацию их эффектов. Молекулярная инженерия, посредством которой были созданы «химерные молекулы» NGF и BDNF, позволила аналитически вычленивать структурные домены нейротрофинов, (сочетания групп аминокислот), определяющих их специфичность в рамках плеiotропной активности (**Ibáñez CF, Ebendal T, Persson H. Chimeric molecules with multiple neurotrophic activities reveal structural elements determining the specificities of NGF and BDNF. EMBO J. 1991;10(8):2105-10.**

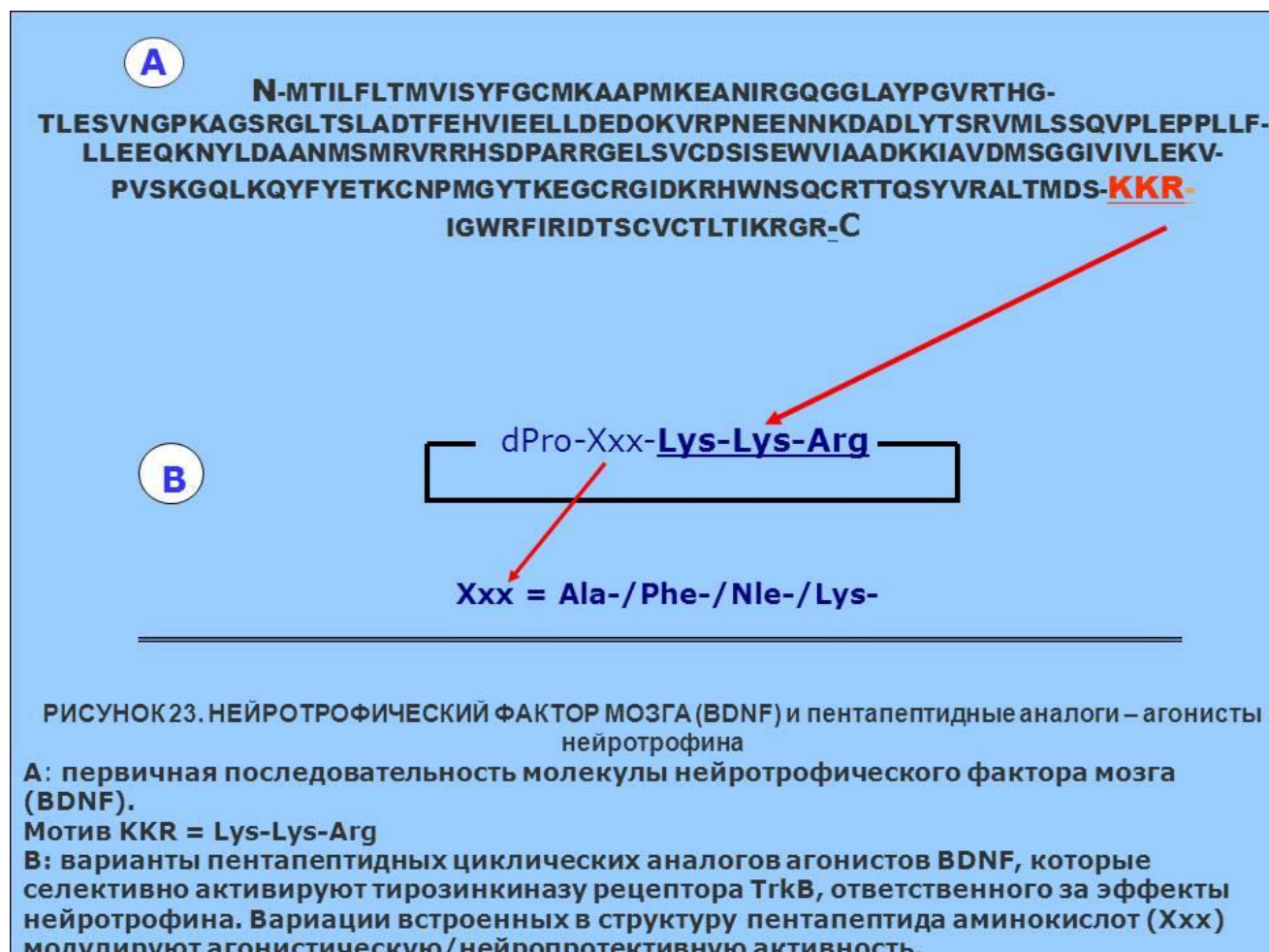
Последующий поиск таких структур следует от просматривания веществ, присутствующих в растениях, традиционно используемых в народной медицине, до скрининга in silico фармакофоров структурной цепочки нейротрофина или ростового фактора. Примеры получения пептидомиметиков рецепторов, лигандных в отношении Trk и p75^{NTR} и их анализа на предмет нейротрофических свойств приведены ниже.

- Был описан “gambogic amide”, селективный агонист Trk-A рецепторов, препятствующий нейроапоптозу in vitro. Этот продукт был выделен из южноазиатского растения *Garcinia hanburyi*, издавна используемого в китайской медицине для терапии рака (**Jang SW, Okada M, Sayeed I, Gambogic amide, a selective agonist for TrkA receptor that**

possesses robust neurotrophic activity, prevents neuronal cell death. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104 (41):16329-34).

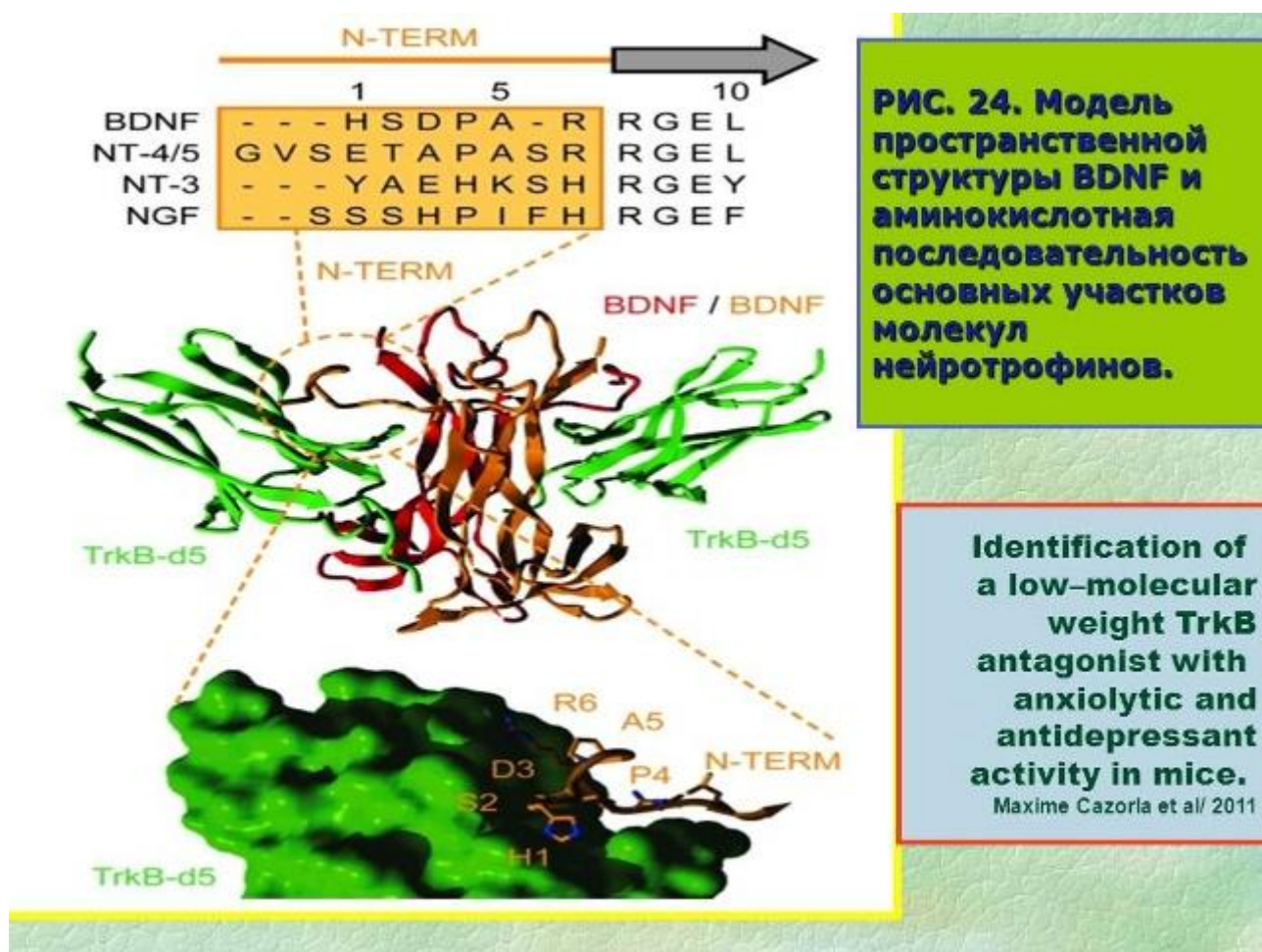
- В результате анализа структуры NGF (см. рис.13) идентифицирован новый лиганд рецептора $p75^{NTR}$, который представлял собой миметик 1-й петли нейротрофина. Вещество с условным шифром LM11A-24 способствовало выживанию культуры гиппокампальных олигодендроцитов, защищая от апоптоза (*Pehar M, Cassina P, Vargas MR, et al. Modulation of p75-dependent motor neuron death by a small non-peptidyl mimetic of the neurotrophin loop 1 domain. Eur J Neurosci. 2006;24(6):1575-80).*

- Были выявлены бивалентные молекулы, лиганды рецепторов Trk-C, которые имитировали эффекты нейротрофинов. Эти соединения селективно стимулировали нейрогенез и потенцировали трофический сигнал нейротрофина NT-3 (*Chen D, Fouad Brahim F, Yu Angell et al/Bivalent peptidomimetic ligands of TrkC are biased agonists, selectively induce neuritogenesis, or potentiate neurotrophin-3 trophic signals. ACS Chem Biol. 2009; 4(9): 769-781).* У возрастных крыс такие соединения существенно улучшали характеристики памяти и обучения (*Bruno MA, Clarke PBS, Seltzer A, et al/Long-Lasting Rescue of Age-Associated Deficits in Cognition and the CNS Cholinergic Phenotype by a Partial Agonist Peptidomimetic Ligand of TrkA. J Neurosci. 2004;24:8009-18).*



- При расшифровке структуры BDNF вычленен трехчленный «мотив» Lys-Lys-Arg, на основе которого были синтезированы пентапептидные аналоги нейротрофина. Эти минипептиды селективно активировали рецепторы Trk-B и моделировали нейропротективный эффект нейротрофина (**РИС. 23**). (*Stranahan AM., Zhou Y., Martin B., and*

Maudsley S.. Pharmacomimetics of exercise: novel approaches for hippocampally-targeted neuroprotective agents. *Curr Med Chem.* 2009; 16(35): 4668). На рис. 24 показана модель пространственной структуры BDNF и основные участки мотивов других нейротрофинов, значимые для связывания с тирозинкиназным рецептором. На этой основе были синтезированы и апробированы в эксперименте гизкомолекулярные соединения, действующие как антагонисты TrkB рецептора с антианксиолитической и антидепрессивной активностью (**Maxime Cazorla et al. 2011. Identification of a low-molecular weight TrkB antagonist with anxiolytic and antidepressant activity in mice).** **РИС. 24.**



- Синтетические аналоги BDNF, полученные как селективные фармакофоры структурной петли BDNF, связываясь с рецептором Trk-B, вызывают нейротрофические эффекты. На модели *in vitro* эти соединения, подобно «самому» BDNF, предотвращали дегенерацию нейронов. В опытах *in vivo* минипептиды активировали рецептор Trk-B в стриатуме и гиппокампе мышей и улучшали моторные когнитивные функции после травмы мозга. (**Massa SM, Yang T, Xie Y, et al. Small molecule BDNF mimetics activate TrkB signaling and prevent neuronal degeneration in rodents. *J Clin Invest.* 2010;120(5):1774-85).**

- Нельзя не обратить внимание на исследование, где циклический пептид, гомолог NGF[28-36], связываясь с рецептором p75^{NTR}, взаимодействовал с молекулой Aβ[1-40], соединением, провоцирующим нейроапоптоз (модель патологии Альцгеймера), и нивелировал его токсический эффект (**Yaar M, Zhai S, Panova I, et al. A cyclic peptide that binds p75(NTR) protects neurones from beta amyloid (1-40)-induced cell death. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2007 ;33(5):533-43).**

Можно акцентировать несколько позиций, существенных для нынешней стадии разработки терапевтических минипептидов.

(1) Включение того или иного типа сигнального процесса и его модуляция «по ходу» биохимической цепочки может корректироваться участием дополнительных белков-кофакторов. Например, $p75^{NTR}$ независимо активирует каскад сигнальных процессов, которые приводят к индукции апоптоза или выживанию клетки. При этом конечный результат зависит от влияния на рецептор $p75^{NTR}$ неких адаптационных белков, ассоциируемых с индукцией или, наоборот, торможением апоптоза (**Roux PP, Barker PA. Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor, Prog Neurobiol. 2002;67(3):203-33).**

(2) Отмечаются сложные корректирующие отношения между рецепторами различных типов. В присутствии TrKA рецептора другой рецептор - $p75^{NTR}$ может участвовать в образовании мест высокоаффинного связывания, стимулируя эффективность NGF для сигнала выживания (**Casaccia-Bonnet P, Kong H, Chao MV. Neurotrophins: the biological paradox of survival factors eliciting apoptosis. Cell Death Differ. 1998 ; 5(5):357-64).**

(3) Обращают внимание работы, где было установлено, что ряд минипептидов воспроизводит эффекты нейротрофинов за счет экспрессии их синтеза и активности.

Такой механизм лежит в основе действия ноопепта (N-фенилацетил-L-пролилглицин этиловый эфир), когда была показана экспрессия мРНК BDNF и NGF в гиппокампе крыс (**Островская Р.У., Гудашева Т.А., Цапина А.П., Вахитова Ю.В., Салингарева М.Н., Ямиданов Р.С., Середенин С.Б. Ноопепт стимулирует экспрессию NGF и BDNF в гиппокампе крысы. Бюлл экп биол мед. 2008, том 148, №3, стр.334-7)** или для другого препарата - нейропепта-1 (Met-Val-Gly), который, стимулируя мРНК BDNF, влиял на уровень самого нейротрофина и улучшал показатели поисковой поведенческой активности у крыс (**Shin MK, Kim HG, Kim KL. A novel trimeric peptide, Neuropep-1-stimulating brain-derived neurotrophic factor expression in rat brain improves spatial learning and memory as measured by the Y-maze and Morris water maze. (Neuropep 1 = Met-Val-Gly) J Neurochem. 2011 Jan;116(2):205-16).** Установлено также, что семакс (АКТГ 4-10) стимулирует синтез NGF и BDNF в гиппокампе и коре мозга крыс (**Agapova TIu, Agniullin IaV, Silachev DN, Shadrina MI, Slominski PA, Shram SI, Limborskaia SA, Miasoedov NF. Effect of semax on the temporary dynamics of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor gene expression in the rat hippocampus and frontal cortex. Mol Gen Mikrobiol Virusol. 2008;(3):28-32).**

Стратегия «малых пептидов» представляет собой принципиально значимое направление поиска новых продуктов, терапевтическое действие которых основано на модуляции активности рецепторов нейротрофинов. Значимость их возможного применения состоит: (а) в избирательности необходимых эффектов, вычлняемых из суммы плейотропной активности нейротрофинов; (б) в возможности их более «удобной» терапевтической аппликации ввиду небольшого размера молекулы.

Стратегия «малых пептидов», находящаяся в большинстве своем в стадии доклинических разработок, призвана увеличить терапевтическую эффективность, аналогичную действию нейротрофинов, за счет лучшей биодоступности, стабилизации молекулы или пролонгирования необходимого эффекта.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нейротрофины – крупные полипептидные молекулы, относящиеся к семейству ростовых нейротрофических факторов, которые участвуют в контроле многообразных функций нервной системы в норме и при патологии. На основании информации о строении отдельных сайтов молекулы нейротрофинов (NGF, BDNF, GNTF, NT-3/-4), их процессинге, стимулируемой экспрессии трансмембранных сигнальных белков формируется целостное представление об ОРГАНИЗУЮЩЕЙ миссии нейротрофинов. Многочисленные данные свидетельствуют, что они реализуют структурную организацию как отдельных клеток мозга, так и нейрональной сети в целом: процессов синаптической пластичности; защиты от деструктивных воздействий окислительного стресса и апоптоза; стимулируют трансформацию прогениторных стволовых клеток как механизма заместительной репарации. Организация нейрональной сети: образование цитоскелета, новых синапсов и рецепторов и поддержание долговременной нейрональной потенциации нейронов – служат основой сохранения равновесия (или компенсаторного восстановления) физиологических процессов в мозге. Эти процессы обеспечивают контроль когнитивных функций зрелого и возрастного мозга (процессов обучения и памяти), его защиту от ишемических, травматических и нейродегенеративных расстройств.

Старение мозга рассматривается как сумма дисбаланса систем химической регуляции клетки, прогрессирующего развития окислительного стресса и апоптоза, деструкции ядерной ДНК, которые приводят к накоплению функционально «негодных» нейрональных структур. Старение сопровождается снижением активности нейротрофических факторов, расстройством пластичности мозга, снижением его «гомеостатического потенциала». Эти процессы провоцируют уязвимость мозга к нейродеструктивным процессам, ишемии, сосудистой деменции, нейродегенеративным заболеваниям. Современная концепция предупреждения старения с использованием «малых пептидов» предусматривает коррекцию с использованием веществ, активирующих тирозинкиназные рецепторы структур мозга.

АВТОР

ГОМАЗКОВ Олег Александрович, профессор, доктор биологических наук, Главный научный сотрудник НИИ биомедицинской химии им. В.Н.Ореховича. Специалист в области изучения регуляторных пептидов и нейротрофических факторов. Автор более 300 научных статей и многих научных монографий («Кинины в физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы», совместно с А.А.Дзизинским (1976. Наука. Новосибирск), «Функциональная биохимия регуляторных пептидов» (1992. Наука.М.), «Пептиды в кардиологии» (2000.Материк Альфа.М), «Нейрохимия ишемических и возрастных заболеваний мозга» (2003.М.), «Нейротрофическая регуляция и стволовые клетки мозга» (2007. М.ИКАР) и другие.

E-MAIL: oleg-gomazkov@yandex.ru