

РЕГУЛЯТОРНЫЕ ПЕПТИДЫ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ БОЛЕЗНИ

И.М.Кветной¹, И.Э.Ингель², В.Х.Хавинсон¹

¹Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии
СЗО РАМН, Санкт-Петербург

²Медицинский радиологический научный центр РАМН, г. Обнинск



Игорь Моисеевич Кветной – заместитель директора по научной работе Санкт-Петербургского Института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, член-корреспондент РАЕН, доктор медицинских наук, профессор.



Ирина Эдуардовна Ингель – старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной патологии медицинского радиологического научного центра РАМН, кандидат биологических наук.



Владимир Хацкелевич Хавинсон – директор Санкт-Петербургского Института биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, заслуженный изобретатель РФ, академик РАЕН, член-корреспондент РАМН, доктор медицинских наук, профессор.

Нарушение структурно-функциональной организации митохондрий лежит в основе патогенеза ряда тяжелых заболеваний, в первую очередь связанных с нейродегенеративными процессами в центральной нервной системе. Регуляторные пептиды, продуцируемые как пептидергическими нейронами, так и эндокринными клетками диффузной нейроэндокринной системы, принимают активное участие в регуляции митохондриальных функций и, тем самым, играют ключевую роль в механизмах развития и клинических проявлениях митохондриальных болезней.

The disturbances of structure-function organization of mitochondria are the basis of pathogenesis of many hard diseases, which in first time are connected with neurodegenerative processes in the central nervous system. Regulatory peptides, which are produced by peptidergic neurons as well as endocrine cells within diffuse neuroendocrine system take active participation in the regulation of mitochondrial function and in this turn play a key role in the mechanism of the development and clinical manifestation of mitochondrial diseases.

Ключевые слова: митохондрии, регуляторные пептиды, болезнь Альцгеймера, мелатонин

Введение

В последние годы большое внимание цитологов, патологов и клиницистов уделяется митохондриям — особым клеточным органеллам, основной функцией которых является утилизация химической энергии в целях жизнеобеспечения органов, тканей и систем организма. Кроме того, недавно показано, что митохондрии являются основным внутриклеточным источником молекул вторичных мессенджеров (промежуточных продуктов реактивного кислорода и других), активно участвующих в биохимических механизмах генной регуляции. Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что структурно-функциональные нарушения митохондрий являются причиной более 100 заболеваний, получивших название «митохондриальные болезни» или «митохондриальные цитопатии» (Schapira, 1993; Luft, 1994). Становится очевидным, что генетические дефекты синтеза митохондриальных белков являются этиопатогенетическими факторами заболеваний, поражающих различные органы и ткани (нервную систему, скелетную мускулатуру, сердечную мышцу, печень, почки и др.). В настоящее время очевидно, что в процесс регуляции транспорта митохондриальных протеинов вовлечены многие факторы, в том числе цитокины, хaperоны, хемокины, нейростероиды, убиквитин и многие другие (Mihara, Omura, 1996; Kroemer, Dallaporta, Resche-Rigon, 1998; Gale, McColl, 1999). В то же время участие и роль биогенных аминов и пептидных гормонов (биологических высокоактивных веществ, продуцируемых нейронами и нейроэндокринными клетками, локализованными в различных органах) в эндогенных механизмах митохондриальных болезней до сих пор остаются неизвестными. Принимая во внимание широкий спектр биологических эффектов биогенных аминов и пептидных гормонов, в особенности их регуляторную роль в процессах внутри- и межклеточной сигнализации, представляется вероятным активное участие этих молекул в патогенезе митохондриальных болезней.

Диффузная нейроэндокринная система

Понятие «диффузная нейроэндокринная система» (ДНЭС) функционально объединяет структурно изолированные в организме нервную и эндокринную системы посредством осуществ-

ления тесных функциональных связей между биогенными аминами и регуляторными пептидами, синтезирующимися в нейронах и эндокринных клетках. ДНЭС составляют более 60 типов клеток, локализованных в желудке, кишечнике, поджелудочной железе, урогенитальном тракте, воздухоносном эпителии, пинеальной железе (эпифизе), щитовидной железе, надпочечниках, аденогипофизе и гипоталамусе, каротидном теле, коже, симпатических ганглиях, тимусе, плаценте и других органах (Raikhlin, Kvetnoy, 1994; Polak, Bloom, 1986; Sundler, Bottcher, 1989; Kvetnoy, Yuzhakov, 1977). Будучи локализованными практически во всех органах и продуцируя биологически активные вещества, клетки ДНЭС выступают в роли регуляторов гомеостаза, а вырабатываемые ими продукты действуют на клетки-мишени посредством нейрокринных, эндокринных и паракринных механизмов (Larsson, 1980; Kvetnoy, Sandvik, 1997). Становится все более и более очевидным, что механизм биологической регуляции базируется на скоординированном функциональном взаимодействии между эндокринной и нервной системой, характеризующемся общим типом восприятия и переноса информации на субклеточном, клеточном и тканевом уровнях.

Многочисленными исследованиями, проведенными в последние годы, убедительно показано, что все три регуляторные системы — нервная, эндокринная и иммунная — имеют единый механизм химической регуляции гомеостаза, ключевым звеном которого являются продукция и секреция целого ряда клеточных медиаторов, объединенных под названием «регуляторные пептиды» (пептидные гормоны, цитокины, хемокины, интегрины и другие).

Для многих регуляторных пептидов и биогенных аминов показана их экспрессия в нейронах и глиальных клетках головного мозга. Там же, кроме того, помимо нейронов, присутствуют и такие иммунокомпетентные клетки, как макрофаги, Т-лимфоциты, эозинофильные лейкоциты и тучные клетки проникающие в мозг при повреждении или воспалении и являющиеся богатыми источниками цитокинов и других активных молекул (Lynn, Wong, 1995; Silver, Silverman, Vitkovic et al., 1996; Dines, Powell, 1997; Ciesielski-Treska, Ulrich, Taupenot et al., 1998).

Учитывая вышеприведенные обстоятельства, представляет большой интерес проанализиро-

вать возможную роль регуляторных пептидов и родственных им молекул в эндогенных механизмах митохондриальных нейродегенеративных заболеваний.

Нейропатология болезней Альцгеймера и Паркинсона

Наиболее важными заболеваниями среди митохондриальных расстройств являются нейродегенеративные заболевания, среди которых особое место занимают болезнь Альцгеймера (БА) и болезнь Паркинсона (БП). БА характеризуется прогрессирующей потерей памяти, приводящей к деменции и смерти. БА подвержены более 20 млн. человек в мире, и ожидается, что через ближайшие 30 лет это число может удвоиться (Price, 1999). БА характеризуется триадой морфологических признаков, в которую входят наличие β -амилоидных бляшек (сенильных бляшек), спутанность нейрофибрилл и обширная деструкция нервной ткани, особенно в гиппокампе и коре головного мозга (Dickson, 1997). Эти патоморфологические изменения обуславливают развитие деменции и характерных нейроповеденческих реакций. Признаки заболевания среди отдельных пациентов могут различаться; в большинстве случаев они возникают спорадически и начинают проявляться в довольно позднем возрасте (после 65 лет); для менее распространенной, т.н. семейной формы БА, характерно существенно более раннее (в 45–50 лет) возникновение признаков болезни (Price, 1999).

Болезнь Паркинсона (БП) представляет собой серьезное нейродегенеративное заболевание с распространенностью порядка 150 случаев на 100000 взрослых людей. Состояние больных характеризуется прогрессирующей дегенерацией допамин-содержащих нейронов в черной субстанции ствола головного мозга; разрушение этих катехоламинергических нейронов сопровождается рядом сенсорных и моторных нарушений, которые приводят к тремору, ригидности и акинезии. По разным оценкам, у больного с выраженными проявлениями БП популяция допаминергических нейронов оказывается истощенной по крайней мере на 80%. Таким образом, в большинстве случаев первые признаки возникновения БП, вероятно, опережают проявление явных симптомов паркинсонизма на 5–10 лет (Olanow, Tatton, 1999).

Молекулярно-клеточные основы патогенеза нейродегенеративных заболеваний

Цитокины. Большинство цитокинов, участвующих в функциях мозга, представлены нейротрофинами (BDNF, нейротрофический фактор мозгового происхождения; NGF, фактор роста нервов, и GDNF, нейротрофический фактор

глиального происхождения) и нейропоэтинами (в особенности интерлейкинами –6 и –8). Они участвуют в механизмах роста и дифференцировки нейронов и в нейротрансмиссии (Merrill, Jonakait, 1995). По-видимому, наиболее богатым источником цитокинов, особенно после локального повреждения, является активированная микроглия, хотя нейроны, астроглия, периваскулярные и эндотелиальные клетки также могут выделять цитокины (Hopkins, Rothwell, 1995).

Изучение локализации и экспрессии пептидных гормонов и цитокинов в ответ на специфические стимулы имеет большое значение для понимания их поведения в ЦНС. Например, сейчас ясно, что экспрессия цитокинов быстро меняется в ситуациях тканевого стресса, и что цитокины при этом играют важную роль в соответствии с их функцией в восстановлении тканевого гомеостаза. Как уже сообщалось, цитокины оказывают влияние на многие центральные нейротрансмиттеры, в том числе норадреналин, серотонин, GABA, а также на экспрессию ряда нейропептидов (соматостатин, субстанция P, опиоиды, VIP, и др.) в некоторых отделах головного мозга (Neumann, Wekerle, 1998). Однако взаимосвязи между многообразными реакциями нейротрансмиттеров и их отношением к специфическим действиям цитокинов еще не вполне выяснены. Аналогично, на ряд систем вторичных мессенджеров в нейронах воздействуют не только цитокины, но и мелатонин, и другие гормоны и медиаторы, включая активацию цАМФ, повышение активности протеинкиназы C, синтез оксида азота, высвобождение арахидоновой кислоты и потока ионов Ca^{2+} (Mrak, Griffin, Graham, 1997; Borjigin, Li, Snyder, 1999). Таким образом, в настоящее время представляется вероятным, что поведение практически всех молекул, участвующих в процессе патогенеза БА и других митохондриальных расстройств, находится под контролем регуляторных пептидов.

На действие цитокинов влияют многие гормоны: глюкокортикоиды являются мощными ингибиторами синтеза и активности цитокинов; кроме того, меланоцит-стимулирующий гормон и вазопрессин ослабляют действие цитокинов в мозге (Rothwell, Hopkins, 1995).

В характеристике патологии БА основной причиной сенильной деменции представляется гибель нейронов в разных участках и накопление внутри- и внеклеточных агрегатов филаментарных протеинов, которые приводят к повреждениям, называемым соответственно нейрофибриллярными «клубками» и сенильными бляшками (Dickson, 1997). Предполагается, что в качестве первостепенных факторов, ответственных за патогенез БА, могут рассматриваться некоторые независимые параметры, а именно — алипопротеин генотипа ϵ , гиперфосфори-

лирование цитоскелетных протеинов или метаболизм амилоида β .

Амилоид β (A β). Предположение о существовании связи между накоплением амилоида и нейрофибрилярными повреждениями остается важной нерешенной задачей в понимании патогенеза БА (Price, Walker, Martin et al., 1992; Auld, Kar, Quirion, 1998; Selkoe, 1998). Амилоидные бляшки (AP), которые являются классическим нейропатологическим признаком БА, были воспроизведены на трансгенных мышах. У этих мышей селективная гибель нейронов отмечалась в тех отделах мозга, которые были наиболее сильно поражены болезнью Альцгеймера, что позволяет предположить непосредственное участие образования AP в гибели нейронов при БА (Calhoun, Wiederhold, Abramowski et al., 1998). С другой стороны, не- β -амилоидный компонент БА-амилоида (NAC) является вторичным компонентом амилоида из ткани мозга больных, страдающих БА (Ueda, Fukushima, Masliah et al., 1993). Показано, что его предшественник, протеин (NACP), является специфическим для мозговой ткани. NACP более распространен в неокортексе, гиппокампе, зрительных буграх, полосатом теле, таламусе и мозжечке. Конфокальный лазерный микроскопический анализ позволил выявить, что анти-NACP иммуоокрашивание оказывается «ко-локализованным» с синаптофизин-иммуореактивными пресинаптическими окончаниями; поэтому NACP является синаптическим протеином. Отсюда следует предположение, что синаптические aberrации, наблюдаемые в сенильных бляшках, могут иметь отношение к амилоидогенезу при БА (Iwai, Masliah, Yoshimoto et al., 1995).

Тау-протеин. Имеются данные о том, что появление нейрофибрилярных повреждений даже в небольшом количестве является патологией и может свидетельствовать о ранних стадиях БА. Многие нейродегенеративные заболевания характеризуются наличием множественных филаментозных повреждений: БА, БП, синдром Дауна, миотоническая дистрофия и др. Тау-протеин ассоциирован с микрофиламентами и участвует в их структурировании и стабилизации (Tolnay, Probst, 1999). В головном мозге взрослого человека экспрессированы 6 изоформ тау-протеина, которые продуцируются в результате альтернативного «сращивания» мРНК одиночного гена, локализованного в длинном плече 17-й хромосомы. Тау-протеин мРНК преимущественно экспрессирована в нейронах, хотя, судя по недавно появившимся сообщениям, этот протеин обнаружен еще и в олигодендроцитах. Внутри нервных клеток тау-протеин находится главным образом в аксонах (Mandelkow, Mandelkow, 1998). В настоящее время выделяют три типа морфологических особенностей филаментов, которые имеют диагностическое значение

(например, тип I чаще идентифицируется при БА; тип II более характерен для БП).

Тау-патология — одна из основных нейропатологических характеристик ряда нейродегенеративных расстройств, поскольку события, приводящие к образованию тау-филаментов, являются фактором, достаточным для начала процесса дегенерации нервных клеток (Lee, Trojanowski, 1999). Поэтому важным направлением будущих исследований представляется выяснение возможных путей (эндо- или экзогенных) предотвращения формирования тау-филаментов. В связи с этим, возможным путем предотвращения формирования тау-филаментов и роста амилоидных бляшек может стать идентификация эндогенных механизмов межпептидных связей.

Представляется вероятным, что биологически активные вещества (нейропептиды, цитокины и т.д.) осуществляют несколько (возможно, различных) действий в нервной системе: коммуникативное действие, т.е. перенос информации о системных повреждениях и других расстройствах к головному мозгу; модулирование мозговых реакций на стимулы со стороны периферических органов; нейромодуляция и нейротрансмиссия в контроле ЦНС системных защитных реакций организма при заболеваниях и повреждениях; ингибирование нейродегенерации и репарации в головном мозге на молекулярном уровне. К настоящему времени можно считать установленным, что пептидные молекулы и родственные им протеины имеют непосредственное отношение к целому ряду неврологических расстройств; это открывает перспективы потенциально плодотворных исследований с возможным выходом в область терапевтического применения.

Синуклеиновые протеины. Некоторые митохондриальные нейродегенеративные расстройства (например, БП) характеризуются наличием внутриклеточных накоплений или включений протеинов, которые обозначаются как тельца Леви (LB). Один из предполагаемых компонентов LB — α -синуклеин. Иммуногистохимически было показано, что в головном мозге отдельных БП-больных LB действительно проявляют выраженную синуклеин-положительную реакцию (Spillantini, Schmidt, Lee et al., 1997). Кроме синуклеина, LB содержат убиквитин, С-концевую гидролазу убиквитина и протеосомальные субъединицы, — главные компоненты процесса дегградации клеточных протеинов (Alves-Rodrigues, Gregori, Figueiredo-Pereira, 1998; Pallares-Trujillo, Lopez-Soriano, Argiles, 1998).

В целом, распределение в головном мозге α -синуклеина аналогично распределению в мозге патологических зон при БА (Alves-Rodrigues, Gregori, Figueiredo-Pereira, 1998). Дополнительные количества синуклеиновых протеинов при

БА присутствуют в амилоидных бляшках. Сообщалось о значительном увеличении цитозольной синуклеиновой иммунореактивности в экстрактах передней коры головного мозга на ранних стадиях БА; представляется вероятным, что α -синуклеин может потенцировать длительное развитие БА (Mezey, Dehejia, Harta et al., 1998).

Хемокины и их рецепторы в ЦНС присутствуют в небольших количествах в астроцитах, микроглии и нейронах развивающегося и взрослого головного мозга и индуцируются медиаторами воспаления (Mennicken, Maki, de Souza et al., 1999). Кроме того, хемокины и их рецепторы претерпевают изменения при различных нейрорегуляторных состояниях, включая опухоли мозга и БА (Asensio, Campbell, 1999). Хемокины также модулируют ангиогенез или неоваскуляризацию в поврежденных участках мозга.

Интегрины составляют основную группу поверхностно-клеточных рецепторов, которые опосредуют прикрепление к экстрацеллюлярному матриксу; специфические классы интегринов также опосредуют важные межклеточные адгезивные взаимодействия. Эти интегрины опосредованные адгезивные взаимодействия тесно связаны с регуляцией многочисленных клеточных функций, включая процессы эмбрионального развития, рост опухолевых клеток, апоптоз, гемостаз и многое другое (Clark, Brugge, 1995). По-видимому, многие системы рецепторов могут синергически взаимодействовать с интегринными в процессах регуляции пролиферации, движения, секреции и других проявлениях деятельности клеток. Сигнальные протеины, активируемые этими синергическими агентами, являются общими для многих рецепторных связей. Таким образом, хотя отдельные процессы могут активироваться индивидуальными классами рецепторов, перекрестное взаимодействие между способами связывания с интегринными и другими рецепторами является «узким местом» в интеграции сигналов, которые сходятся на поверхности клеток в их естественном окружении *in vivo*.

Хапероны. Молекулярные хапероны (Hsp28, α -В-кристаллин) также участвуют в развитии БА (Martinus, Ryan, Naylor et al., 1995). Детальное выяснение роли молекулярных хаперонов произошло в результате изучения биогенеза митохондриальных белков, — процесса, в котором хапероны действуют следующим образом: «открыть, втащить и закрыть». Одним из таких хаперонов является фактор стимуляции митохондриального импорта (MSF) (Hachiya, Alam, Sakasegawa et al., 1993). По-видимому, этот фактор является модулятором структуры предшественника митохондриальных протеинов.

Цитохромоксидаза С. Появляется все больше доказательств того, что дефекты энергетичес-

кого метаболизма способствуют патогенезу БА. Цитохромоксидаза С кинетически неправильна, и ее активность в мозге и периферических тканях при позднем возникновении БА снижена (Davis, Miller, Herrnst et al., 1997). Коэнзим Q мог бы выполнить эту роль; его уровень снижен относительно цитохромоксидазы. Признаком процесса старения является увеличение с возрастом числа отрицательных по отношению к цитохром С-оксидазе мышечных волокон в сердечной и скелетных мышцах. Кроме того, представлено доказательство существования изменений уровня коэнзима Q, связанных с возрастом и соответствующих апоптозу в некоторых тканях крыс и человека (Green, 1998).

Нейростероиды. К настоящему времени установлено, что в ткани мозга ряда позвоночных происходит синтез стероидов *de novo* из холестерина (Paul, Purdy, 1992). Главная роль в формировании и метаболизме нейростероидов в головном мозге принадлежит клеткам глии (Kreutzberg, 1996). Клетки Пуркиньи продуцируют нейростероиды (прегненолон и прогестерон). На этих клетках показано иммунопозитивное окрашивание с антителами к ключевому ферменту стероидогенеза — P450_{scc} (Tsutsui, Ukena, 1999). Показано, что прогестерон (один из основных нейростероидов) вырабатывается из прегненолона шванновскими клетками в периферических нервах, и некоторые наблюдения указывают на роль локально продуцированного прогестерона в миелинизации, демонстрируя тем самым, что прогестерон — не просто половой гормон; с его участием возможен новый терапевтический подход к стимуляции миелиновой репарации (Koenig, Schumacher, Ferzaz et al., 1995).

Кислородные радикалы. Многие заболевания, связанные со старением, могут вовлекать кислородные радикалы в патологический процесс на разных стадиях своего развития. Предполагается, что при этих заболеваниях мутации митохондриальной ДНК и изменения биоэнергетики клеток участвуют некоторым образом в процессах старения и в развитии дегенеративных заболеваний (Shigenaga, Hagen, Ames, 1994). Оксид азота (NO), который только недавно был обнаружен как физиологический мессенджер, все с большей вероятностью рассматривается в качестве главного регулятора нервной, иммунной и сердечно-сосудистой систем (Nathan, 1992). Предполагается, что, помимо опосредования нормальных физиологических функций, NO может участвовать в развитии многих различных патологических состояний, включая нейродегенеративные заболевания (Ames, Shigenaga, Hagen, 1993). (Ввиду очевидной токсичности побочных продуктов деятельности кислорода, не удивительно, что нервная ткань разрушается с большей скоростью, чем другие.)

Митохондриальная ДНК (мтДНК) имеет уровень оксидативных повреждений на порядок выше, чем ядерная ДНК (Ames, Shigenaga, Hagen, 1993). Это превышение может быть обусловлено недостаточностью репаративных ферментов и гистонов, защищающих ДНК, а также близостью мтДНК к оксидантам, образующимся в процессе окислительного фосфорилирования. Клетка защищает себя от такой высокой скорости повреждений с помощью постоянной замены митохондрий, — например, удаляя поврежденные митохондрии, которые продуцируют слишком много оксидантов. Однако, несмотря на эти меры, оксидативные повреждения, по-видимому, с течением времени все же накапливаются в мтДНК в большей степени, чем в ядерной ДНК. Оксидативные повреждения могут также быть причиной мутаций в мтДНК, которые с возрастом аккумулируются (Smith, Sayre, Monnier et al., 1995).

В последние годы все более доминирует концепция, согласно которой оксидативный стресс является виновником разрушения нейронов при БА, и появляется все больше доказательств того, что свободные радикалы принимают непосредственное участие в патогенетическом преобразовании нервной системы при БА (Reiter, 1995). Предполагается, что свободные радикалы, которым инкриминируют разрушение нейронов, генерируются амилоидом (A β) (Smith, Sayre, Monnier et al., 1995).

В соответствии со свободнорадикальной теорией БП, допаминергические нейроны разрушаются вследствие относительно высокой частоты воздействия на них реактивных кислородных соединений, особенно H₂O₂ (перекиси водорода), которая продуцируется в процессе как ферментативной (через моноаминоксидазу) активности, так и неферментативной (обусловленной самоокислением) деструкции допамина (Fahn, Cohen, 1992). Оксидативный стресс не только разрушает допаминергические нейроны, но также подвергает митохондрии окислительному фосфорилированию, приводящему к уменьшению выработки энергии этими органеллами, и в конечном итоге — к гибели этих клеток.

Глутамат. Возрастает количество экспериментальных доказательств того, что оксидативный стресс является причинным или, по крайней мере, вспомогательным фактором в нейропатологии некоторых дегенеративных заболеваний у взрослых (Reiter, 1998). В то время, избыток или устойчивая активация пропускающих глутамат ионных каналов может быть причиной дегенерации нейронов в тех же условиях. Предполагается, что глутамат и родственные кислые аминокислоты являются главными возбуждающими нейротрансмиттерами в мозге и могут быть утилизированы 40% синап-

сов (Coyle, Puttfarcken, 1993). Поэтому два главных механизма — оксидативный стресс и избыточная активация рецепторов глутамата — сходятся и образуют последовательные, а также взаимодействующие процессы, которые обеспечивают общий конечный путь для развития болезни. Разнообразие в мозге процессов, регулирующих оксидативный стресс и опосредующих глутаматергическую нейротрансмиссию, может объяснить обширный диапазон расстройств, в которых участвуют оба механизма. Однако различная экспрессия компонентов этих процессов в отдельных нейронных системах влечет селективную нейродегенерацию при некоторых расстройствах. Хотя NO участвует в нормальной синаптической трансмиссии, избыточные уровни NO нейротоксичны. NO стимулирует нейротоксичность глутамата, которая может способствовать развитию дисфункции при нейродегенеративных заболеваниях, таких как болезни Альцгеймера и хорея Хантингтона.

Появляются доказательства того, что активация пропускающих глутамат катионных каналов может быть важным источником возникновения оксидативного стресса, и что эти два механизма могут действовать как по отдельности, так и совместно (усиливая друг друга), приводя к селективной дегенерации нейронов. Понимание связи между оксидативным стрессом и нейротрансмиссией глутамата могло бы привести к разработке фармакологических воздействий, которые разорвали бы эту цепь патологических событий, не нарушая перенос нейровозбуждений.

Кальциевый гомеостаз. Старение мозга связано с заметным снижением умственных способностей. Одна из гипотез основана на предположении, что главной причиной дегенерации нейронов являются происходящие при старении изменения регуляции внутриклеточной концентрации ионов Ca²⁺ (Choi, 1995). Эта «кальциевая гипотеза» подтверждается демонстрацией ухудшения в старых нейронах молекулярных каскадов, которые регулируют внутриклеточную концентрацию Ca²⁺. Концептуальными основами этой точки зрения являются: дисфункция гомеостаза внутриклеточного Ca²⁺ и гибель нейронов (Verkhatsky, Toescu, 1998). Такая точка зрения на стареющий мозг основывается на представлении, что снижение умственных способностей происходит главным образом вследствие гибели нейронов, что приводит к уменьшению числа клеток мозга. Весомая поддержка этой гипотезы обнаружилась в процессе изучения нейродегенеративных заболеваний, таких как БА. При БА отмечается глубокое опустошение мозга нейронами, что хорошо коррелирует со снижением способностей к обучению и функций памяти (Dickson, 1997). Кроме того, показано, что ключевой элемент патологии БА — ак-

кумуляция Ca^{2+} разрушает внутринейронный кальциевый гомеостаз (Verkhatsky, Toescu, 1998). В мозге содержится огромная популяция клеток глии, которые ответственны за регуляцию мозгового микроокружения. Они могут также играть важную роль в интегративных функциях нейронов, контролируя концентрации нейротрансмиттеров и нейромодуляторов и влияя таким образом на синаптическую передачу. Состояние клеток глии, особенно астроцитов, в значительной степени определяется внутринейронным кальциевым гомеостазом, что означает его участие в большинстве реакций этих клеток на нейротрансмиттеры (Kreutzberg, 1996).

Апоптоз. Так или иначе, гибель нейронов является финальной стадией нейродегенеративных заболеваний и этот феномен известен как апоптоз (Sastri, Rao, 2000). В процессе развития нервной системы позвоночных около 50% или более нейронов обычно погибают вскоре после того, как сформируют синаптические связи с соответствующими клетками-мишенями (Raff, Barres, Burne et al., 1993). Исследования, предпринимаемые с целью найти объяснение внутриклеточным молекулярным событиям, которые регулируют выживаемость клеток и приводят их к гибели (Davies, 1995), сосредоточены на *Bcl-2* и родственных протеинах. Выяснение диапазона и функционального значения взаимодействий между этими протеинами, а также идентификация последовательности молекулярных событий, в которых они участвуют, значительно расширит наши представления о процессе апоптоза. Кроме того, нейроны особенно полезны для изучения регуляции выживаемости клеток и апоптоза, поскольку представляют собой постмитотические клетки, вследствие чего экспериментальный анализ их не осложнен явлениями клеточной пролиферации. К тому же, выяснение роли *bcl-2* — родственных протеинов в некоторых нейронах может иметь важное терапевтическое применение при нейродегенеративных заболеваниях (Hockenbery, Oltvai, Yin et al., 1993).

Роль ключевого гормона ДНЭС — мелатонина в патогенезе митохондриальных заболеваний

В последнее десятилетие много внимания уделяется мелатонину, одному из гормонов ДНЭС, который в течение многих лет рассматривали исключительно как продукт секреции пинеальной железы (Reiter, 1973; 1992). С появлением высокочувствительных антител к индолалкиламинам (Grot, Brown, 1974) мелатонин идентифицировали не только в пинеальной железе, но также в экстрапинеальных тканях, то есть в ретине, мозжечке, слизистой оболочке кишечника, воздухоносном эпителии, почках и

других тканях (Kvetnoy, 1999), а также и в эндодермальных клетках, таких как тучные клетки, естественные киллеры, эозинофильные лейкоциты, тромбоциты, клетки эндотелия (Kvetnoy, 1999) и костного мозга (Tan, Manchester, Reiter et al., 1999). Кроме того, недавно показано, что многие клетки в различных органах обладают рецепторами к мелатонину; также во многих отделах головного мозга человека обнаружено множество рецепторов к мелатонину (Pang, Dubocovich, Brown et al., 1993). Приведенный выше перечень клеток, содержащих мелатонин, показывает, что этот индолламин занимает особое положение среди гормонов, будучи обнаруженным в ряде систем органов, включая ЦНС. По-видимому, функционально мелатонин — продуцирующие клетки являются неотъемлемой частью ДНЭС как универсальной системы контроля и защиты организма. Учитывая большое количество мелатонин-продуцирующих клеток, широкий спектр биологической активности мелатонина и особенно его свойства регулятора биологических ритмов и антиоксиданта, экстрапинеальный мелатонин можно рассматривать как важную паракринную молекулу, обеспечивающую оптимальное выполнение функций клеток, в том числе и защитных.

К настоящему времени известно, что мелатонин является мощным поглотителем гидроксильных радикалов и при некоторых обстоятельствах защищает от свободных радикалов более эффективно, чем хорошо известный поглотитель — глутатион (Cuzzocrea, Tan, Costantino et al., 1999). Известно, что мелатонин поглощает высоко токсичные гидроксильные радикалы, анионы пероксинитрита, синглетный кислород и NO . Кроме того, сообщается, что мелатонин поглощает, кроме упомянутых, еще и радикал супероксидного аниона (Cuzzocrea, Tan, Costantino et al., 1999). Помимо этого, мелатонин повышает уровень мРНК для супероксиддисмутазы и активности глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы и глутатозо-6-фосфатдегидрогеназы (все они являются антиоксидантными ферментами), тем самым увеличивая свою антиоксидантную способность (Reiter, Guerrero, Garcia et al., 1998). Кроме того, мелатонин ингибирует синтез оксида азота, про-оксидативный фермент, и стимулирует фермент, ограничивающий скорость синтеза глутатиона, α -глутамил-цистеин синтазу (Barlow-Walden, Reiter, Abe et al., 1995). Имеется достаточно доказательств того, что мозг больных БП имеет выраженные признаки усиленного оксидативного стресса. Acuna-Castroviejo с соавторами (Acuna-Castroviejo, Coto-Montes, Monti et al., 1997) изучили способность мелатонина защищать мозг от токсических эффектов МРТР — препарата, вызывающего паркинсоноподобные симптомы. В этой модельной системе мелатонин проявил выраженные защитные свой-

ства. Также, Mayo с соавт. (1998) определили способность мелатонина защищать ткани от индуцированного аутоокислением допамина повреждения белков, основанную на поглощении им кислородных радикалов. Результаты исследования показали, что мелатонин снижает степень окисления флюоресцентного протеина, которая лежит в основе анализа; отсюда следует, что мелатонин предотвращает повреждения макромолекул, являющиеся результатом аутоокисления допамина. Авторы предположили, что это может быть обусловлено способностью мелатонина к поглощению свободных радикалов, и что этот индол может оказывать благотворный эффект, снижая окислительное повреждение в мозге больных БП.

Поскольку окислительный стресс может быть лишь одним из признаков, общим для многих нейродефицитных состояний, и в то же время очевидно, что эти заболевания имеют в высшей степени сложную этиопатологию, то представляется маловероятным, чтобы какой-то один агент мог полностью противостоять их развитию. Кроме того, действительно имеется необходимость в понимании механизмов, лежащих в основе дегенерации нейронов.

Мелатонин как потенциальное средство борьбы с нейродегенеративными заболеваниями представляет интерес по следующим причинам: эндогенная продукция его с возрастом падает, что совпадает с возникновением многих возрастных нейродегенеративных условий (Reiter, Guerrero, Garcia et al., 1998); мелатонин легко проникает через гематоэнцефалический барьер и после экзогенного введения обнаруживается в мозге в высоких концентрациях, иногда многократно превышающих показатели его содержания в крови (Reiter, 1995); мелатонин является повсеместно действующим поглотителем свободных радикалов и антиоксидантом (Reiter, 1997), эффективность которого по критерию снижения окислительного повреждения и сохранения неврологических функций показана на моделях многих неврологических заболеваний (Reiter, 1998).

Перспективы дальнейших исследований

Несмотря на то, что изучение поведения и роли различных биологически активных веществ в патогенезе митохондриальных заболеваний отражено в значительном количестве публикаций, большинство из них посвящены конкретно одному или двум типам молекул. Таким образом, не хватает комплексных исследований, в которых изучалось бы поведение многих молекул в одно и то же время и на одних и тех же пациентах.

Мы полагаем, что теперь необходимо идентифицировать не только одни цитокины или другие из вышеупомянутых молекул и выяснить

их действие, непосредственно связанное с физиологической регуляцией и патологическими процессами, но также изучить механизмы их связей и взаимодействий. Ясное понимание этих процессов, в сочетании с развитием методов воздействия на исследуемые соединения, может позволить приобрести значительный терапевтический потенциал для успешного лечения митохондриальных заболеваний.

Необходимо подчеркнуть, что, пока пациент жив, отличия между разными формами деменции остаются клиническими оценками. Диагноз такой специфической формы деменции, как проявления БА, подтверждается только аутопсией. Это обстоятельство диктует необходимость поиска прижизненных маркеров для диагностики и прогноза БА и родственных митохондриальных заболеваний.

Это представляется возможным, поскольку результаты некоторых недавних исследований (Gasparini, Racchi, Binetti et al., 1998; Miklossy, Adei, Martins et al., 1999) позволили предположить, что БА может быть не только заболеванием центральной нервной системы, но системным нарушением. Если так, то использование периферических клеток и тканевых биопсий человека может представлять собой перспективное средство для прижизненной диагностики БА и других нейродегенеративных заболеваний.

Мы полагаем, что дальнейшие исследования в этом направлении должны включать перечисленные ниже шаги для лучшего понимания меж- и внутриклеточных механизмов нейродегенерации, а также для разработки новых перспективных прижизненных маркеров заболеваний.

Главными этапами таких исследований представляются следующие:

- **Изучить молекулярные основы БА и БП, связанные с дефектами митохондриальных механизмов транслокации протеинов** (идентифицировать новые субъединицы транслоказы внешней митохондриальной мембраны (Tom — комплекс) и охарактеризовать соответствующие им гены).
- **Осуществить иммуноцитохимическое картирование и анализ микроскопических проявлений БА и БП** (идентифицировать локализацию большинства ключевых молекул, участвующих в патогенезе нейродегенеративных заболеваний мозга человека; подробно изучить функциональную морфологию клеточных и тканевых структур, иммуноцитохимически позитивных к вышеупомянутым молекулам, и сравнить их с патологическими повреждениями на световом и электронномикроскопическом уровнях в аутопсийном мозге больных БА и БП).
- **Разработать новые методы прижизненной диагностики и лечения БА и БП** (принимая во внимание важную роль мелатонина как

поглотителя свободных радикалов, представляется весьма перспективным выяснить роль мелатонина во внутриклеточных механизмах нейродегенеративных заболеваний и разработать его в качестве нового прижизненного маркера для диагностики БА и БП. Для достижения этой цели должны быть решены следующие вопросы: 1) идентифицировать ключевые молекулы этих нарушений (т.е. β -APP, тау-протеин, убиквитин, допамин, NO-синтазу) и мелатонин в лимфоцитах крови человека от здоровых добровольцев и больных БА и БП, и таким образом показать, что лимфоциты крови могут быть использованы как подходящий объект для прижизненной диагностики БА и БП; 2) провести количественный иммуноцитохимический анализ концентрации β -APP, тау-протеина, убиквитина, допамина, NO-синтазы и мелатонина в лимфоцитах больных БА и БП; 3) определить экскрецию с мочой продуктов взаимодействия мелатонина с радикалами: циклического 3-гидроксимелатонина (3-HMT), N^1 -ацетил- N^2 -формил-5-метоксикинуранина (AMFK), N^1 -ацетил-5-метоксикинуранина (AMK), (Tan, Manchester, Reiter et al., 1998), а также 6-сульфатоксимелатонина (aMT6s) у больных БА и БП; 4) идентифицировать полиморфизмы и мутации гена Tom20 в лимфоцитах крови человека в обычной по-

пуляции и у больных БА и БП; 5) изучить корреляции между экспрессиями гена Tom20, β -APP, тау-протеина, убиквитина, допамина, NO-синтазы и мелатонин в лимфоцитах здоровых людей, а также больных БА и БП, и сравнить затем индексы экспрессии в исследованных группах; 6) на основе результатов вышеупомянутого исследования выяснить биологическую роль мелатонина во внутриклеточных механизмах нейродегенеративных заболеваний и разработать мелатонин в качестве нового неинвазивного маркера для прижизненной диагностики, определения прогноза и эффективности специфической терапии для каждого больного БА и БП.

Резюмируя изложенный материал, следует подчеркнуть, что ДНЭС и ее гормоны, будучи мультифункциональными биологически активными молекулами, локализованными повсеместно в организме, включая головной мозг, играют важную роль в патогенезе БА, БП и других нейродегенеративных и митохондриальных заболеваний. Дальнейшие исследования в этой области представляются очень эффективными как для выяснения молекулярных и клеточных основ патологических механизмов дегенерации нейронов, так и еще более – для разработки оптимальных методов диагностики и терапии митохондриальных заболеваний.