

УДК 579.8.616.83

©Алесенко

ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ СФИНГОЛИПИДОВ В НЕЙРОПАТОГЕНЕЗЕ БОЛЕЗНИ АЛЬЦГЕЙМЕРА

А.В. Алесенко

Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, 119334 Москва,
ул. Косыгина, 4; факс: (7) 499 137 4101; эл. почта: ales@sky.chph.ras.ru

Обсуждается функциональная роль сфинголипидов в патогенезе болезни Альцгеймера. Представлены доказательства того, что нарушение баланса сфинголипидов, таких как сфингомиелин, церамид, сфингозин, сфингозин-1-фосфат и гликозилцерамид в мозге животных и человека, в спинномозговой жидкости и плазме крови пациентов с болезнью Альцгеймера играют решающую роль в нейрональной функции благодаря регулированию скорости роста, дифференцировки и смерти клеток ЦНС. Активация сфингомиелиназы, приводящая к накоплению проапоптотического агента – церамида, может рассматриваться в качестве нового механизма БА, что может служить предпосылкой для терапии этого заболевания путем использования препаратов, ингибирующих активность сфингомиелиназы. Обсуждается роль сфинголипидов в качестве биомаркеров для диагностики ранней стадии болезни Альцгеймера и мониторинга эффективности её лечения препаратами нового поколения.

Ключевые слова: болезнь Альцгеймера, сфинголипиды (сфингомиелин, церамид, сфингозин, сфингозин-1-фосфат сульфатиды), масс-спектрометрия сфинголипидов, мозг, цереброспинальная жидкость, плазма крови, биомаркеры.

ВВЕДЕНИЕ. Болезнь Альцгеймера (БА) является наиболее частой причиной слабоумия, развивающегося у лиц пожилого и старческого возраста. В настоящее время БА страдает значительная часть населения в возрасте 60 и старше лет. В США и Европе, где проводится серьезный мониторинг данного заболевания, число пожилых людей, страдающих деменцией альцгеймеровского типа, составляет около 12 млн. человек. Прогнозируется, что их число возрастёт до 42 млн человек к 2020 г., а к 2040 г. – свыше 80 млн

Принятые сокращения: БА - болезнь Альцгеймера; ДИС - (диссоциация, индуцированная столкновением); β A - β -амилоидный пептид; APP - предшественник β -амилоидного пептида; SMase - сфингомиелиназа; SM - сфингомиелин; Cer - церамид; DHCer - дигидроцерамид; DHSM - дигидросфингомиелин; CerS - церамидсинтаза; СМЖ - спинномозговая жидкость; ЦНС - центральная нервная система.

[1]. По данным эпидемиологических исследований, выполненных в НЦПЗ РАМН, общая численность больных, страдающих БА в России, в настоящий момент составляет около 1,4 млн. человек [1]. Данное заболевание требует дорогостоящего и длительного лечения и ухода за больными. В связи с этим чрезвычайно важным является изучение новых механизмов его возникновения и поиск новых эффективных средств, предупреждающих или замедляющих развитие БА, а также использование в клинике инновационных методов тестирования эффективности лечения этого заболевания.

Принято считать, что ключевым механизмом развития патологии мозга альцгеймеровского типа является токсическое действие β -амилоидного пептида (β A) - составной части бляшек и воспалительные процессы, опосредованные цитокинами [1, 2]. Отложение β A и созревание сенильных бляшек вызывает множество молекулярных изменений различного рода, которые приводят к прогрессирующей дисфункции и смерти нервных клеток по типу апоптоза или некроза [2]. Однако молекулярные механизмы этиологии и патогенеза БА остаются неизвестными.

В последнее десятилетие для расшифровки механизма БА все большую актуальность приобретают липиды клеток мозга в качестве основных компонентов клеточной мембраны, участвующих в процессинге и агрегации β A и в проведении цитотоксического сигнала, индуцируемого как β A так и провоспалительным цитокином ФНО- α [1-3]. В связи с этим чрезвычайно важным является исследование изменений липидного спектра в клетках мозга животных, у которых моделируется БА, и в периферических жидкостях (крови и спинномозговой жидкости) пациентов, страдающих БА, в ходе развития заболевания и его лечения.

Полученные данные дают представление о тесной связи патогенеза заболевания с нарушением синтеза в мозгу фосфолипидов, холестерина и сфинголипидов. Особое внимание привлекают сфинголипиды [4], так как ряд из них участвует в процессинге и олигомеризации β A пептида и в нарушении синаптической функции при БА.

Особое значение приобретает точный и информативный метод анализа липидного спектра, который по своим критериям соответствовал бы требованиям современной медицины. Таким методом в настоящий момент является масс-спектрометрия, позволяющая однозначно, быстро и в большом количестве проб с минимальным объёмом исследуемого материала дать характеристику сложного спектра разнообразных липидных компонентов биологического материала.

Перспективным является также поиск эффективных препаратов, участвующих в коррекции липидного спектра, нарушения которого зафиксированы в ходе этого заболевания.

1. МЕТАБОЛИЗМ СФИНГОЛИПИДОВ.

Класс сфинголипидов представляет собой высокоактивные биологические соединения, которые служат не только компонентами мембраны, но и участвуют в регулировании клеточной пролиферации, дифференцировки, межклеточных взаимодействиях, миграции клеток, внеклеточной и внутриклеточной передаче сигналов и в гибели клеток [5-10]. Для каждой из этих функций существует свой подкласс сфинголипидов, но внутри каждого подкласса присутствие или отсутствие определенных двойных связей может иметь существенное влияние на их функции [11, 12].

Сфинголипидный метаболизм является чрезвычайно сложным процессом и включает сотни молекулярных видов и метаболических путей [5].

В основе структуры всех сфинголипидов лежит алифатический аминокиспирт сфингозин. В состав сфингозина входят заряженные группы, такие как этаноламин, серин или холин, которые через амидную связь связываются с ацильными группами, с жирными кислотами. Церамиды являются простейшими сфинголипидами, состоящими из жирной кислоты, прикреплённой посредством амидной связи к сфингозину. Церамид является предшественником сфингомиелина, в составе которого фосфорилхолин или фосфоэтаноламин прикреплены к 1-гидроксигруппе церамида. Церамиды могут деацилироваться до сфингозина, который, в свою очередь, фосфорилируется, образуя сфингозин-1-фосфат. Глико-сфинголипиды также являются производными церамида, к которому добавляется один или несколько сахарных остатков, присоединённых с помощью α -гликозидной связи к 1 гидроксилу церамида (рис. 1).

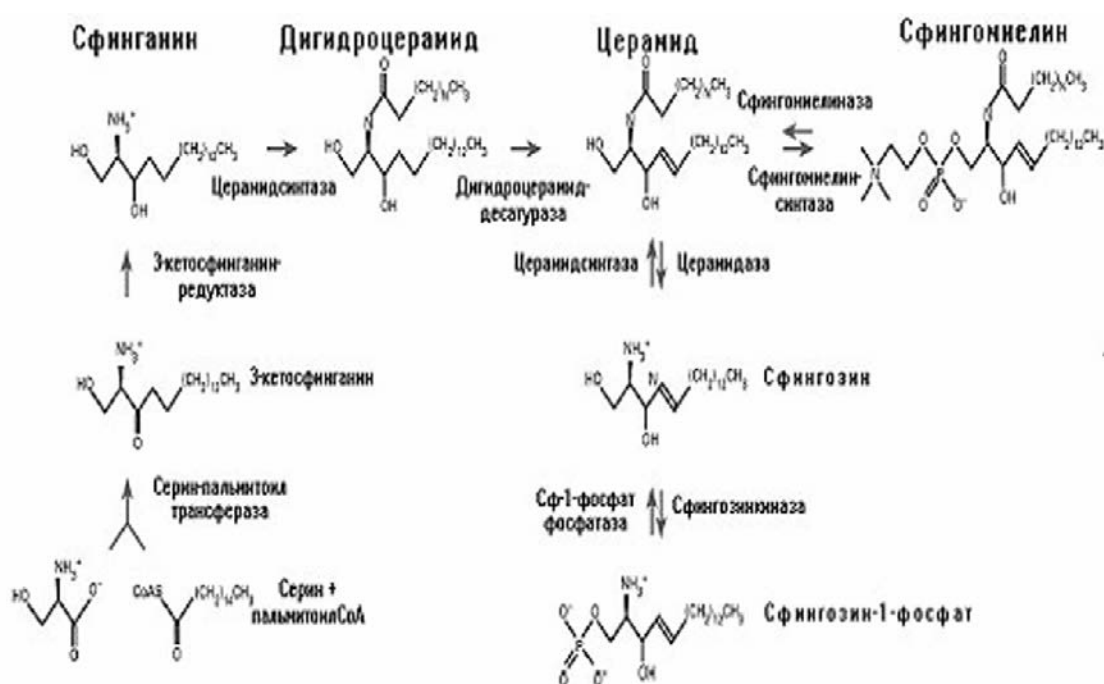


Рисунок 1.

Метаболизм сфинголипидов (адаптировано из [5]).

Центральная нервная система содержит большое количество сфинголипидов, метаболиты которых выполняют не только структурную роль в мембранах, но и являются источниками вторичных посредников, которые осуществляют передачу многочисленных клеточных сигналов [13]. Метаболизм сфинголипидов осуществляется посредством многочисленных ферментов.

Синтез церамида *de novo* осуществляется на плазматическом ретикулуме путём конденсации серина и пальмитоил-СоА с помощью пальмитоилтрансферазы с образованием 3-кето-дигидросфингозина. 3-кето-дигидросфингозин восстанавливается до дигидросфингозина с помощью 3-кето-дигидросфингозинредуктазы. Полученный дигидросфингозин N-ацилируется церамидсинтазой с образованием дигидроцерамида, который, в итоге, превращается в церамид с помощью дигидроцерамиддесатуразы. У млекопитающих ацильная цепь церамида содержит от 16 до 26 углеродных

атомов, в зависимости от типа церамидсинтазы, участвующей в синтезе церамида. В настоящий момент известно 6 церамидсинтаз (CerS1-CerS6). CerS1 включает жирную кислоту C18, CerS2: C20-C26, CerS3: C18 и C24, CerS4: C18 и C20, CerS5: C16, CerS6: C14 и C16. Однако кроме перечисленных церамидсинтаз в синтезе церамида участвуют и другие ферменты, в частности, сфингомиелиназы и церамидазы [4].

Сфингомиелиназы (SMase) гидролизуют сфингомиелин до церамида и фосфохолина [14, 15]. Сфингомиелиназы характеризуются определёнными различиями по pH до оптимума активности (кислая - aSMase, щелочная - alkSMase и нейтральная - nSMase), локализацией в клетке и зависимостью от ионов металлов. Кислая aSMase является Zn^{2+} -зависимой и преимущественно локализуется в лизосомах [14], хотя встречается и секретируемая форма [16]. Структура щелочной alkSMase отличается от других типов сфингомиелиназ (она принадлежит семейству нуклеотид пирофосфатаз/фосфодиэстераз), но её ферментативные свойства совпадают с другими ферментами, расщепляющими сфингомиелин до церамида [17]. Особенно много кислой aSMase в слизистой кишечника и желчи, где она расщепляет сфингомиелины, поступающие с пищей [18]. Кислая aSMase активно и в больших количествах экспрессируется в клетках мозга, равномерно на всём протяжении его развития. Недостаток этого фермента в лизосомах клеток мозга приводит к нейродегенеративному заболеванию - болезни Нимана-Пика.

Семейство нейтральных сфингомиелиназ, наивысшая активность которых проявляется при pH 7,4, представлено 3 видами, различающимися локализацией в клетке и зависимостью от ионов. nSMase1 является Mg^{2+} -зависимой с молекулярной массой 47,5 кДа и локализуется в эндоплазматическом ретикулуме [19], а nSMase2 - в аппарате Гольджи [15, 19, 20] и этот тип сфингомиелиназ может транслоцироваться в перинуклеарное пространство в ответ на антиоксидантное действие глутатиона, а в ответ на оксидативный стресс nSMase2 переходит на плазматическую мембрану [20]. nSMase3 можно обнаружить в аппарате Гольджи, эндоплазматическом ретикулуме и плазматической мембране [21]. Также как и кислая сфингомиелиназа, нейтральная изоформа фермента активно экспрессируется в клетках мозга, особенно его экспрессия активизируется при нейрональном развитии.

О функциональной роли nSMase1 и nSMase3 до сих пор довольно мало сведений, в то время как роль nSMase2 вполне доказана в клеточной сигнализации и патогенезе ряда неврологических заболеваний [15].

В настоящий момент твёрдо установлено, что nSMase2 имеет отношение к нейродегенеративным заболеваниям, таким как старческое когнитивное слабоумие, БА, деменция при СПИДе, болезнь Хантингтона, рассеянный склероз, боковой амиотрофический склероз (прогрессирующая мышечная атрофия), инсульты и др. В патогенезе этих заболеваний имеются общие черты, такие как усиленный нейрональный апоптоз или оксидативный стресс.

Церамид превращается в сфингомиелин путём переноса с помощью фосфатидилхолин трансферазы фосфохолиновой группы из фосфатидилхолина на церамид. Такой тип фосфатидилхолинтрансферазы называется сфингомиелинсинтазой (SMS). Обнаружено два типа фермента - SMS1 и SMS2. У человека SMS1 локализуется в аппарате Гольджи, в то время как SMS2 первоначально появляется на плазматической мембране [22, 23].

Кроме участия в синтезе сфингомиелина, церамид может превращаться в сфингозин и жирные кислоты при действии церамидаз. Подобно

сфингомиелиназам, церамидазы также различаются по рН оптимуму их ферментативной активности и локализации в клеточном пространстве. К настоящему времени известно 5 церамидаз [10]. Кислая церамидаза локализована в лизосомальных компартментах, нейтральная церамидаза преимущественно находится в плазматической мембране, три щелочных церамидазы обнаружены в аппарате Гольджи и плазматической мембране.

Сфингозин превращается с помощью сфингозин киназы в антиапоптотический агент - сфингозин-1-фосфат [24].

Ганглиозиды представляют собой обширное семейство сфинголипидов, которые в большом количестве содержатся в мозге человека и животных. В состав ганглиозидов входят гликосфинголипиды, состоящие из церамидов и олигосахаридов, и одной или более сиаловых кислот, прикреплённых к сахаридной цепи. В настоящий момент известно более 40 ганглиозидов, различающиеся главным образом положением и числом остатков сиаловых кислот. Ганглиозиды – важные структурные элементы мембран нервных клеток и составляют приблизительно 6% от общего содержания липидов в клетках мозга. Глюкозилцерамидсинтаза, известная также как глюкозилцерамидтрансфераза, катализирует первую стадию гликозилирования в биосинтезе гликосфинголипидов [25]. Различные виды ганглиозидов неравномерно распределены в нервных клетках. Например, ганглиозид GD1a присутствует в больших количествах в гранулярных клетках, чем в клетках Пуркинье. Для ганглиозидов GT1a характерно противоположное распределение [26, 27].

К настоящему времени стало очевидно, что такие простые сфинголипиды как церамид, сфингозин, сфингозин-1-фосфат и гликозилцерамид играют решающую роль в нейрональной функции благодаря регулированию скорости роста, дифференцировки и смерти клеток ЦНС. Нарушение баланса содержания различных классов сфинголипидов приводит к нарушению нейрональной функции и апоптозу клеток мозга.

Все перечисленные классы сфинголипидов претерпевают значительные изменения в ходе развития БА и, как в настоящее время установлено, участвуют в патогенезе данного заболевания.

2. АНАЛИЗ СФИНГОЛИПИДОВ МЕТОДАМИ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ.

Поскольку количество сфинголипидов может достигать нескольких тысяч, необходим метод анализа, который бы разделял все липиды в соответствии с типом сфингоидного основания, жирнокислотными остатками и типом гидрофильной головы. Жидкостная хроматография, сопряжённая с тандемной масс-спектрометрией, является на сегодняшний день единственным методом, позволяющим исследовать все эти молекулы даже в небольших количествах [28-31].

Сфинголипиды исследуют методами масс-спектрометрии последние сорок лет [32, 33], при этом использовались различные методы ионизации, в том числе МАЛДИ (матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация) [34-37] и ионизационный электроспрей [28-30]. Работали также и с различными типами анализаторов: с секторными [39], квадрупольными [28], времяпролётными [34-36, 38], ионными ловушками [28, 40] и масс-спектрометрами ионного циклотронного резонанса с преобразованием Фурье [37]. В результате этих исследований было установлено, что масс-спектрометрия является наилучшим методом изучения сфинголипидов, поскольку обладает:

1. высокой специфичностью, позволяющей по массе молекулы определить её состав (особенно при использовании тандемной масс-спектрометрии);

2. высокой чувствительностью по сравнению с классическими методиками (масс-спектрометрия позволяет узнать о наличии молекул, концентрация которых составляет несколько фемтомолей на 10^6 клеток);

3. возможностью проводить количественный анализ при использовании внутренних и внешних стандартов;

4. широким динамическим диапазоном (несколько порядков величины), позволяющим исследовать биологические объекты, в которых диапазон концентраций различных молекул может отличаться на несколько порядков.

Успехи масс-спектрометрии основаны на химии газофазных реакций, и на том, образуют или нет исследуемые вещества ионы, обнаружение которых в спектре свидетельствует о наличии определенных веществ в растворе. В этом отношении сфинголипиды анализировать очень просто, поскольку они достаточно легко ионизируются, а фрагментация ионов даёт исчерпывающую информацию об углеводородном составе молекул и о типе гидрофобной части молекулы. Например, все сфинголипиды образуют положительно заряженные протонированные ионы $[M+H]^+$, а сфингозин-1-фосфаты, сфингомиелины, сульфатиды и ганглиозиды образуют также депротонированные отрицательно заряженные ионы $[M-H]^-$. Проведение фрагментации как простых, так и сложных сфинголипидов позволяет узнать тип гидрофильной части молекулы и жирнокислотный состав. Однако, поскольку при фрагментации заряд обычно остается на гидрофильной части молекулы (как, например, в случае сфингомиелинов), то для подробного исследования структуры жирных кислот, присоединенных к сфингоидному основанию, необходимо проводить дополнительный анализ (методом MS/MS/MS). В силу сложности анализируемых молекул, и, как следствие, большого количества возможных осколков, образующихся при фрагментации, была разработана специальная номенклатура для описания этих осколков, позволяющая определить состав исходной молекулы по “отпечаткам пальцев” (fingerprint) [39, 41, 42].

При анализе молекул со сфингоидным основанием, а также сфингозин-1-фосфатов методом анализа материнских ионов, необходимо помнить, что молекулы, содержащие 4 и более двойных связей, образуют более интенсивные дочерние ионы, чем молекулы с меньшим количеством двойных связей. Это означает, что при проведении количественного анализа необходимо использовать стандарты как для молекул без двойных связей, так и для молекул с двойными связями. Кроме того, насыщенные молекулы (например, сфинганины) образуют при проведении ДИС (диссоциация, индуцированная столкновением) с высокой энергией дочерние ионы с m/z 60, которые являются более специфичными, чем обычные продукты дегидратации. Оптимизация условий ионизации и ДИС для молекул со сфингоидными основаниями приводит к интересным результатам при их количественном определении [28-30]. Количественное определение молекул со сфингоидным основанием методом анализа материнских ионов сопряжено с определёнными сложностями. Во-первых, ионизация может подавляться присутствием большого количества других молекул в экстракте. Во-вторых, необходимо учитывать влияние эффективных размеров молекулы (т.е. длины цепи и количества двойных связей) на процесс фрагментации. Ионы с меньшим количеством атомов обладают меньшим количеством степеней свободы,

поэтому на каждую из них приходится большая энергия, что может приводить к дополнительной фрагментации. При тех же условиях для больших молекул на каждую степень свободы приходится меньше энергии, поэтому фрагментация проходит менее эффективно, что снижает сигнал от этих ионов. Этот эффект хорошо заметен при исследовании С2-церамидов и природных длинноцепочечных церамидов [43]. Однако среди природных церамидов, у которых длина цепи составляет от 16 до 26 атомов углерода, этот эффект выражен меньше.

Поскольку молекула с одним и тем же элементным составом может иметь различную структуру, при масс-спектрометрическом анализе зачастую используют жидкостную хроматографию (ЖХ/МС) [28-30, 40]. В связи с тем, что масс-спектрометр сам по себе может разделять молекулы по их массе, то хроматографическую колонку используют для разделения изомерных и изобарных молекул, которые масс-спектрометр различить не сможет, а также для уменьшения количества веществ, проходящих за единицу времени в камеру ионизации, что позволяет улучшить чувствительность. Последней цели можно также добиться уменьшением скорости потока растворителей, однако это приведёт к увеличению времени, необходимого для анализа одного образца, поэтому необходимо соблюдать баланс между этими параметрами.

Для анализа сфинголипидов широко используются два типа хроматографического анализа: с обращенной фазой (разделение основано на гидрофобности молекул, например, для отделения сфингозина от сфинганина) и с нормальной фазой (разделение происходит по типу полярной части молекулы, например, для отделения церамидов от сфингомиелинов). Использование хроматографии не всегда очевидно, поскольку, например, сфингозин и сфинганин можно разделить на основании столкновительной диссоциации. Однако если в биологическом образце содержится большое количество сфингозина, то его изотопное распределение не позволит провести количественный анализ сфинганина до тех пор, пока эти вещества не будут разделены хроматографически. Тем не менее, есть работы, в которых сфинголипиды анализируются путём прямого ввода [44, 45]. Преимуществом такого подхода является значительное уменьшение времени анализа одного образца. К сожалению, этот подход возможен только при определённых условиях, когда изотопные пики не перекрываются, что происходит довольно редко, или же если образец подвергся предварительному хроматографическому разделению.

3. УЧАСТИЕ СФИНГОЛИПИДОВ В АМИЛОИДОГЕНЕЗЕ.

БА отличается от других когнитивных патологий, вызывающих клиническую деменцию, накоплением в ткани мозга агрегатов β А, являющегося основным компонентом так называемых сенильных бляшек. Последние являются одним из характерных морфологических признаков БА. β А с молекулярной массой в 4 кДа, впервые охарактеризованный в 1985 г. [46], образуется в результате протеолитического расщепления конститутивного трансмембранного белка(предшественника амилоидного пептида или APP β -amyloid precursor protein) под действием β - и γ -секретаз. Существует также альтернативный путь расщепления APP при участии α -секретазы, который не завершается образованием амилоидного пептида. В нормальных условиях этот процесс является основным путём превращения β APP. Однако при развитии БА активность α -секретазы снижается, а скорость амилоидогенных процессов под действием β - и γ -секретаз повышается, что ведёт к ускоренному образованию β А. Последний обладает высоко выраженными фибриногенными

свойствами и его олигомеры являются токсичными для нервных клеток, вызывая дегенерацию нейронов и нарушение синаптической передачи [47].

Особое внимание уделяется изучению роли липидов в амилоидогенезе, который, как принято считать, играет ключевую роль в индукции и развитии БА [46]. Первичной мишенью β A является плазматическая мембрана нейронов, а её липидная компонента принимает непосредственное участие в реализации нейротоксичности β A.

У больных по сравнению с контрольной группой значительно снижено молярное отношение [холестерин]:[фосфолипиды], являющееся основной физиологической характеристикой текучести мембран, изменение которого может активировать процессинг β A из предшественника β A (APP) и приводить к повышению уровня β A в ткани мозга [48]. Снижение вязкости мембран определяется прежде всего изменением липидного состава, в частности, сфинголипидов, которые являются одним из главных компонентов липидной фазы плазматических мембран нервных клеток. Именно снижение уровня сфингомиелина, вероятно, способствует отложению амилоида и образованию сенильных бляшек; такие изменения в составе мембран могут также влиять на активность ферментов процессинга APP.

Наиболее значимые конформационные переходы β A происходят в присутствии сфинголипидов. Фосфолипиды и ганглиозиды способны взаимодействовать с β A и менять его конформацию, что может частично определять нейротоксичность β A [49-51]. Альцгеймеровский β A содержит мутационный домен, который специфически взаимодействует с галактозилцерамидом и сфингомиелином в мономолекулярных плёнках [52]. В присутствии ганглиозид-содержащих везикул происходит ускоренное образование β A фибрилл. β A1-42, связанный с ганглиозидами, был обнаружен в мозге пациентов с БА на ранних стадиях развития заболевания [53]. Предполагается, что образование таких структур может служить предпосылкой для последующего образования β A бляшек [52, 53]. Обнаружение факторов, приводящих к комплексообразованию GM1/ β A, может обозначить новый механизм патогенеза БА и также дать возможность разработать новую стратегию предупреждения и лечения этого заболевания.

В последнее время показано, что особую роль в агрегации β A играют специфические домены на плазматической мембране, называемые рафтами, участвующие в клеточной сигнализации [54, 55]. Рафты обогащены гликосфинголипидами, холестерином, сфинголипидами и мембранными белками, участвующими в проведении внеклеточных сигналов [54, 55].

Известно, что предшественник β A (APP) транспортируется и протеолитически расщепляется секретазами α , β , γ , которые включены в холестерин-сфингомиелиновые домены и, следовательно, эти липиды и изменение их соотношения в рафтах может отражаться на транспорте и процессинге APP [55]. Таким образом, липидный состав рафтов, включающий ганглиозиды, сфингомиелин, холестерин и церамиды могут строго контролировать процессинг APP и агрегацию β A.

Предполагается, что увеличение немембранного холестерина, который накапливается в процессе старения, является фактором риска развития БА. Однако анализ содержания холестерина в десяти структурных областях мозга пациентов с БА продемонстрировал неоднозначную вариабельность, в то время как концентрация убихинона однозначно была выше нормы на 30-100% [56]. Более того, у умерших больных было зафиксировано уменьшение содержания холестерина. Однако это может отражать терминальную стадию болезни,

так как на начальном её этапе довольно эффективными являются статины, снижающие уровень холестерина. Эти препараты рекомендованы также для профилактики БА [57].

По сравнению с холестерином содержание сфингомиелина было снижено в мозге пациентов с БА и установлено резкое накопление длинноцепочечных церамидов [58, 59].

4. ИССЛЕДОВАНИЕ СФИНГОЛИПИДОВ НА МОДЕЛЯХ БА У ЖИВОТНЫХ.

Моделирование БА у животных проводится, как правило, на грызунах: мышах, крысах, морских свинках. Наиболее распространенной является методика получения мутантных животных, геном которых несет мутантные гены APP, пресенилинов 1 и 2 и белка τ [60]. Однако эти мутации не отражают полностью всех случаев БА. У мутантных мышей не наблюдается выраженной гибели нейронов. Кроме трансгенных мышей в последнее время появились трансгенные крысы, которые несут признаки болезни Альцгеймера [61].

Инъекционные модели основываются на введении животным нейротоксинов, вызывающих преимущественную гибель специфических популяций нейронов; также довольно популярны инъекционные модели, в которых используется интрацеребральное введение β A или его фрагментов [62, 63], а также в некоторых случаях провоспалительных цитокинов, например, фактора некроза опухоли [ФНО- α] [64].

Однако введение β A в мозг животным не приводит к образованию сенильных бляшек и нейрофибриллярных клубков, но тем не менее данные модели позволяют моделировать когнитивные нарушения на ранних этапах БА [62]. В инъекционных моделях используются преимущественно мыши и крысы [61-63].

Некоторыми авторами используется модель спорадической формы БА. Нейродегенерация альцгеймеровского типа инициируется удалением обонятельных луковиц (бульбэктомия, БЭ), которые тесно связаны с деятельностью лимбических структур, участвующих в процессах обучения и памяти. Наиболее адекватным этот тип модели осуществляется на морских свинках, у которых аминокислотная последовательность β A аналогична таковой у человека [65]. Однако на этой модели показано, что на начальных стадиях развития патологии наблюдается стимуляция истинного нейрогенеза в мозге БЭ животных, что противоречит данным о снижении нейрогенеза в стареющем мозге человека и животных [65].

Примером исследования сфинголипидов на мутантных животных, модулирующих болезнь Альцгеймера, может служить работа [66], в которой определяли содержание церамидов, сфингомиелинов, сульфатидов и галактозилцерамидов в коре мозга дважды трансгенных мышей APP[SL]PS1Ki, экспрессирующих человеческий APP751 со шведской и лондонской мутациями в комбинацией с пресенилином-1. Было обнаружено значительное накопление церамидов в коре этих животных по сравнению с мышами дикого типа и PS1Ki, в то время как другие сфинголипиды, кроме галактозилцерамида, не претерпевали заметных изменений.

Нами впервые было показано, что введение β A или ФНО- α в мозг крыс приводит к активации сфингомиелиназы и накоплению церамида. Этот процесс наиболее выражен в гиппокампе по сравнению с корой и мозжечком [64].

Хроническое повышение внутриклеточных церамидов может замедлять элонгацию аксонов и интернализацию фактора роста нервов [67]. Церамиды в нервных клетках вовлечены в апоптотические программы [13, 68].

Эти сигнальные молекулы способны стимулировать как протеинкиназную, так и фосфатазную сигнальные системы [69]. β A и церамид расположены в пределах одних и тех же рафтов, которые являются структурными элементами мембраны, и содержат в своём составе необходимые сигнальные системы для индукции апоптоза. В β A-индуцированном апоптозе принимает участие p75-рецептор ФНО- α и FAS лиганд, которые представляют собой семейство клеточных рецепторов, использующих сфингомиелин-церамидный путь для проведения сигнала апоптоза [68].

Более того, β A и церамид вызывают митохондриальную дисфункцию и индуцируют окислительный стресс [70]. Не только увеличение церамида в результате гидролиза сфингомиелина происходит в ответ на стрессовые сигналы и апоптоз, но и наблюдается повышение его синтеза в этих условиях. Таким образом, результаты, полученные в модельных экспериментах, позволяют предположить, что церамид играет существенную роль в патогенезе БА, механизм его действия можно представить в виде последовательности событий, при которых β A прежде всего индуцирует окислительный стресс и гидролиз сфингомиелина до церамида, завершающегося апоптотической гибелью нейронов.

Высокое содержание ганглиозидов характерно в ткани мозга и их очень часто используют в качестве биомаркеров биохимических патологий нервной системы [71]. Известно, что ганглиозиды участвуют в начальной стадии агрегации β A [50-53, 55]. Довольно подробно изучается метаболизм ганглиозидов на различных моделях БА с использованием трансгенных животных [72]. В зависимости от вида модели наблюдается разнообразный ход изменений в содержании различных ганглиозидов в структурах мозга животных, что говорит об очень тонкой настройке механизма амилоидогенеза с участием ганглиозидов.

5. РОЛЬ СФИНГОМИЕЛИНАЗЫ В ПАТОГЕНЕЗЕ БА.

Несмотря на многочисленные исследования механизм апоптотической гибели нейронов под действием β A до сих пор не установлен. Однако в экспериментах на клетках мозга получены прямые доказательства того, что в проявлении цитотоксичности β A определенную роль играет фермент обмена сфинголипидов - SMase [59, 73-79].

На клетках первичных нейронов показано, что их обработка фибриллярным β A вызывает экспрессию nSMase и повышение содержания церамида [76]. При блокировании этого фермента снижалась гибель клеток, что подтверждает необходимость nSMase для проявления цитотоксичности фибриллярного β A [76]. Ингибирование nSMase глутатионом также уменьшает гибель дендроцитов [74]. Эти результаты подтверждаются и в исследовании токсического влияния пептида β A25-35 на глиальные и эндотелиальные клетки. Также как и в первом случае, был обнаружен нейропротекторный эффект в результате добавления S-нитрозоглутатиона [75].

Однако необходимо отметить неоднозначность результатов, касающихся сфингомиелиназ, ответственных за гибель клеток, индуцированную β A. Например, при действии пептида β A на дендритные клетки мышей активируется кислая SMase, а её инактивация обеспечивает устойчивость этих клеток к апоптозу при действии β A [77]. В противоположность этому, растворимый олигомер β A вызывает активацию как нейтральной, так и кислой SMase. Специфическое ингибирование фермента и нокдаун каждого из них обеспечивает резистентность клеток к β A-индуцированному апоптозу [80]. Эти данные позволяют предположить участие обеих типов SMase в реализации

апоптоза нервных клеток, индуцированного β A. Нами было показано, что введение β A или ФНО- α в мозг крыс приводит к активации нейтральной SMase. Этот процесс наиболее выражен в гиппокампе по сравнению с корой и мозжечком [13]. Однако в мозге умерших пациентов, страдавших БА, обнаружена активация только кислой SMase [81]. При анализе экспрессии генов, ответственных за синтез кислой SMase и нейтральной SMase2, было показано, что их активность резко повышается в мозге пациентов как с БА, так и с другими нейропатологиями [82].

Поскольку активация SMase изучалась на различных клеточных линиях, при действии разных форм β A, в экспериментах на животных и в посмертных препаратах мозга человека, неудивительно, что однозначных результатов не получено. До сих пор нет трансгенной модели животных, которая бы полностью имитировала патофизиологический процесс БА, всё еще не ясно какой тип β A является ответственным за клеточную гибель и потерю когнитивной способности у человека. Хотя локальная концентрация фибриллярного β A пептида, присутствующего в мозге пациентов с БА, может отличаться от концентрации β A в первичных нейронах, используемых в экспериментах, тем не менее данные, свидетельствующие о связи между активацией сфингомиелиназы, накоплением церамида и последующей гибелью нейронов и олигодендроцитов указывают на то, что сфингомиелиназа может быть терапевтической мишенью для лекарств, предупреждающих нейродегенеративные нарушения, вызванные БА.

6. СФИНГОМИЕЛИНЫ ПРИ БА.

По сравнению с церамидом изучение уровня сфингомиелина в структурах мозга пациентов с БА проводятся менее активно. Разными исследователями получены совершенно противоположные результаты. В работах [83-85] найдено, что уровень сфингомиелина повышается, а Culter и He показали его снижение при БА [58, 59]. Однако имеются также данные, что на всех стадиях заболевания не происходит изменений в содержании сфингомиелина в мозге пациентов с БА [86].

До сих пор не известно с чем связаны такие различия: с исследованиями, проводимыми на разных стадиях заболевания, либо с разными структурами мозга, где определяли содержание сфингомиелина.

7. МЕХАНИЗМ УЧАСТИЯ ЦЕРАМИДА В ПАТОГЕНЕЗЕ БА.

Различные факторы, такие как цитокины, факторы роста, гормоны, окислительный стресс и радиация активируют SMase в различных тканях, приводя к накоплению церамида в них [6]. Гораздо меньше известно о механизмах, ответственных за активацию SMase в нейронах и в активированных глиальных клетках, приводящих к значительным повышению уровня церамида. Знание механизма активации глиальных клеток чрезвычайно важно, поскольку с этим процессом связана потеря нейронов при развитии ряда нейродегенеративных заболеваний, включая БА. В экспериментах, в которых использовались астроциты – главные представители глиальных клеток, активированные 1 мкМ β A1-42 в комбинации с 10 нг/мл IL-1 β , изучался механизм их токсического действия на первичные нейроны человека [73, 87]. Было показано резкая активация нейтральной SMase и накопление церамида в нейронах в процессе их гибели, индуцированной активацией астроглии. Активация нейтральной SMase в нейронах определяется NO, генерируемым активированной астроглией. В то же время установлено, что в активированных астроцитах нейтральная SMase способна индуцировать экспрессию мРНК

индуцибельной NO синтазы (iNOS). Также было установлено, что экспрессия провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 β , IL-6 в активированной астроглии зависит от нейтральной SMase. Участие β A в генерации церамида подтверждается тем, что только пептид β A1-42, но не его реверсионная форма (β A41-1) индуцирует активацию SMase и генерацию церамида в нейронах [88]. Кроме того, именно фибриллярная форма пептида по сравнению с растворимой была наиболее эффективна в генерации церамида [88]. β A индуцирует апоптоз также и в олигодендроцитах. При этом также как и в нейронах наблюдается повышение уровня церамидов [89], активация каспазы-8 и фрагментация ДНК [77]. Добавление в клеточную культуру олигодендроцитов церамида или бактериальной SMase, повышающей содержание церамида, приводит их к гибели [77, 89]. Более того, ингибитор сфингомиелиназ (3-метил-сфингомиелин) эффективно защищает олигодендроциты от действия β A [89].

Чрезвычайно важна роль экспрессии iNOS при токсическом действии β A на клетки мозга. Механизм активации сигнальной системы NO и развития окислительного стресса при действии β A в клетках ЦНС показан на примере олигодендроцитов [78]. Этот процесс сопровождается активацией метаболического пути, в который вовлечена нейтральная SMase и в результате которого накапливается церамид [90]. Однако показано, что и церамид, и β A в этих клетках самостоятельно не вызывают экспрессию iNOS. Необходимо накопление TNF- α , который и индуцирует этот процесс, в то время как β A способен активировать только нейтральную SMase. Этот факт важен для понимания механизма развития БА, в патогенезе которой провоспалительная составляющая играет важную роль [78].

Фактор роста нервов вызывает повышение уровня церамида в клетках глиомы T9 и гиппокампальных нейронах в результате активации нейтральной SMase [67]. В некоторых случаях, связанных со стресс-активированными сигналами, происходит активация кислой SMase в нейронах гиппокампа [92]. Поскольку различные SMase локализованы в клетках в различных компартментах, то это означает, что на разного типа стимулы генерируются разные пулы церамидов [68]. Особое значение для развития апоптоза, индуцируемого β A, имеет пул церамидов, локализованных в митохондриях [93].

В экспериментах на животных показано, что микроинъекция β A1-42 в кору мышей линии C57/BL6 вызывает 3-х кратное накопление церамида в коре, которое индуцируется нейтральной SMase, в то время как активность кислой SMase в этих условиях не меняется [73]. β A, введенный в мозг крыс, способствует накоплению церамида преимущественно в гиппокампе [64].

Это находит подтверждение в повышенном уровне церамидов в мозге и спинномозговой жидкости пациентов с БА по сравнению с другими неврологическими патологиями, причём церамид накапливается в мозге пациентов уже на ранних стадиях заболевания [86, 94, 95]. По другим данным, уровень церамида снижен в белом веществе средней фронтальной мозговой извилины у пациентов с БА по сравнению с контролем [86]. Эти различия, по-видимому, определяются стадией заболевания, поскольку в исследовании [86] показано, что на ранней стадии деменции уровень церамида повышен, в то время как на поздней стадии отмечено понижение содержания церамида в структурах мозга.

При анализе 6 молекулярных видов церамида, которые отличаются по длине их жирных кислот, в мозге пациентов с БА и другими нейропатологиями было обнаружено повышение уровня Cer16, Cer18, Cer20

и Cer24 при всех нарушениях функций мозга. При комбинации БА с другими патологиями уровень церамида оказывается самым высоким [82]. Наиболее определенные результаты были получены при изучении экспрессии генов, которые контролируют синтез, метаболизм и деградацию церамида в процессе развития БА. Наблюдается разнонаправленная активация генов, отвечающих за содержание церамида в структурах мозга при специфических формах заболевания по сравнению с контролем [96]. Чётко установлено, что синтез ферментов, контролирующих синтез церамида [96], в особенности церамидов, содержащих длинноцепочечные жирные кислоты C22:0 и C24:0, был активирован на ранней стадии заболевания, в то время как синтез глюкозилцерамида, напротив, был снижен. То есть, уровень разных типов церамидов может меняться зеркально на разных стадиях заболевания.

В ряде исследований отмечено, что сигнальная система сфингомиелинового цикла связана с окислительным стрессом [13, 90]. Установлено, что активные формы кислорода непосредственно влияют на сфингомиелиназу, либо на другие ферменты, которые, в свою очередь, регулируют активность сфингомиелиназы. Это может приводить к усилению токсического действия на клетки мозга цитокинов и β A в результате их совместного действия. Следует отметить, что природный антиоксидант глутатион ингибирует активность SMase. Снижение уровня глутатиона приводит к активации фермента и накоплению церамида в олигодендроцитах, вызывая их гибель [89]. В клинической практике довольно успешно применяется антиоксидантная терапия, что подтверждает эффективность ингибирования процессов, связанных с активацией окислительных систем при развитии БА. Однако до сих пор не установлено происходит ли ингибирование и сфингомиелинового каскада в этих условиях.

Таким образом, индукция сфингомиелинового цикла, приводящая к накоплению проапоптотического агента – церамида, может рассматриваться в качестве нового механизма БА, что может служить предпосылкой для терапии этого заболевания путём использования препаратов нового поколения, ингибирующих активность сфингомиелиназы [97-99].

8. СФИНГОЗИН И СФИНГОЗИН-1-ФОСФАТ ПРИ БА.

Сфингозин, который обладает свойствами проапоптотического агента, накапливается в мозге умерших пациентов с БА по сравнению с нормальным контролем [81]. Повышена и активность кислой церамидазы, превращающей церамид в сфингозин [81, 100, 101]. Однако до сих пор не известно, накапливается ли сфингозин или активируется фермент, генерирующий его из церамида, на ранней стадии заболевания. Следовательно, не известна роль сфингозина в патогенезе БА.

Сфингозин-1-фосфат (СФЗ-1-Ф) - фосфорилированный продукт сфингозина в противоположность церамиду и сфингозину обладает антиапоптотическими свойствами и участвует в регуляции клеточной пролиферации [24]. Существуют единичные данные, указывающие, что уровень СФЗ-1-Ф уменьшается в цитозольной фракции серого вещества лобно-височной области мозга при БА по сравнению с контролем [81]. Уровень СФЗ-1-Ф также негативно коррелирует с уровнем β A и фосфорилированным белком τ в той же области мозга [81].

9. ИЗМЕНЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ СУЛЬФАТИДОВ В СТРУКТУРАХ МОЗГА ПРИ РАЗВИТИИ БА.

Сульфатиды цереброзидов в большом количестве содержатся в мозге и представляют собой галактозил-3 сульфаты цереброзидов. Предшественником сульфатидов является галактозилцерамид. Имеются единичные исследования

об изменении уровня галактозилцерамида в мозге пациентов с БА. При БА его содержание увеличивается в средней фронтальной извилине (middle frontal gyrus) по сравнению с контролем, в то время как в мозжечке остаётся неизменным [58]. Не было найдено различий в содержании галактозилцерамида и сульфатидов в липидах рафтов, выделенных из фронтальной коры мозга БА по сравнению с контролем. Эти данные указывают, что в различных структурах мозга при развитии БА происходят специфические изменения галактозилцерамида и сульфатидов. Более того, отмечено, что эти различия проявляются в зависимости от стадии заболевания. Уровень сульфатидов резко снижается на ранней стадии БА, а затем остаётся неизменным вплоть до терминальной стадии [85, 86, 102].

Авторы этих исследований предполагают, что изменения в концентрации сульфатидов в определенных областях мозга отражают изменения в содержании амилоидных бляшек, которое резко увеличивается на начальной стадии болезни, однако их количественный рост замедляется на средней и поздней стадии деменции.

10. ИССЛЕДОВАНИЕ СФИНГОЛИПИДОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ ПРИ БА.

10.1. Сфинголипиды в спинномозговой жидкости при БА.

Спинномозговая жидкость (СМЖ) наиболее адекватно может отражать патологические изменения в мозге, вызванные БА. Как правило, у пациентов с БА изучают нарушения в липидном спектре мозга только на терминальной стадии, исследования же липидов СМЖ позволяют проследить за развитием заболевания, а также за эффективностью его лечения.

Оптимистичные результаты по диагностике начальной стадии БА получены при исследовании сульфатидов и отношения сульфатида/фосфатидилинозита [102]. Были обнаружены вполне достоверные различия в отношении сульфатида/фосфатидилинозита между контролем и начальной стадией деменции Альцгеймеровского типа, в то время как различий между контролем и начальной стадией БА в содержании β A1-42, τ и p- τ 231 в СМЖ обнаружено не было. Поэтому сульфатиды, очевидно, могут быть более достоверным маркером для диагностики ранней стадии БА [102].

Анализ содержания церамида в СМЖ пациентов с разнообразными неврологическими заболеваниями (цервикальный спондилёз, боковой амиотрофический склероз, метаболическая энцефалопатия, инсульт) показал, что при БА его содержание значительно выше, чем при этих патологиях и в контроле [103]. Наиболее высокое содержание церамида было обнаружено при средней тяжести заболевания по сравнению с начальной и тяжелой [104].

Однако не проводились корреляции между изменением содержания в СМЖ церамида и β A, τ и p- τ 231, что позволило бы определить более конкретную роль церамида в патогенезе БА.

Тем не менее, в литературе обсуждается возможность использования церамидов в качестве маркеров БА [104-106]. Некоторым ограничением может служить неспецифичность этого параметра для БА, поскольку уровень церамидов в СМЖ меняется и при других нейропатологиях. Однако, церамид можно использовать в качестве маркера стадии развития заболевания. До сих пор для диагностики глубины патологии мозга используются только когнитивные и поведенческие симптомы, но они проявляются уже на далеко зашедших стадиях нарушений функций мозга. Изменения же в церамидах могут сигнализировать о ранних нарушениях при БА, которые, возможно, могут поддаваться медикаментозной коррекции [104].

При анализе сфингомиелинов методом масс-спектрометрии было установлено, что их уровень повышается на ранней стадии заболевания, в то время как между средней и тяжелой стадиями заболевания практически нет различий. Эти данные подтверждают, что нарушения в метаболизме сфинголипидов могут служить диагностическим маркером риска развития БА [105].

10.2. Сфинголипиды крови при БА.

При анализе в крови биомаркеров при различных нейропатологиях возникает вопрос существует ли прямая корреляция между измерениями в крови и процессами, осуществляющимися в мозге. А может быть, благодаря функции гематоэнцефалического барьера изменения в крови могут быть связаны с мозгом через сосудистое русло? Поэтому необходимо установить закономерность изменения уровня сфинголипидов в процессе развития БА.

Обнаружено, что содержание церамида в крови понижено на ранней стадии БА, в то время как в мозге и спинномозговой жидкости – повышено [104, 105]. Эти изменения коррелировали с нарушением когнитивных функций у пациентов. Однако таких исследований до сих пор выполнено недостаточно для того, чтобы использовать церамиды крови для ранней диагностики БА и необходимы дальнейшие изучения корреляций между содержанием церамидов в плазме крови и спинномозговой жидкости на всём протяжении БА. Некоторые исследователи предполагают, что определение корреляции между изменениями сфинголипидов в крови и в СМЖ у пациентов с БА, и особенно на ранней стадии заболевания, позволят использовать сфинголипиды в качестве биомаркеров БА и, возможно, в качестве мишеней для лекарственных средств нового поколения [104, 105].

В последнее время интенсивно изучается связь между изменениями в спектре сфинголипидов плазмы крови пациентов с БА и развитием когнитивных нарушений для предсказания скорости развития деменции на основании результатов анализа сфинголипидов [104-106]. Эта задача может быть решена благодаря развитию метода масс-спектрометрии и его успешного применения в липидологии.

В работах М.М. Mielke и соавт. [105] содержание церамидов (Cer), дигидроцерамидов (DHCer), сфингомиелинов (SM) и дигидросфингомиелинов (DHSM) было изучено у 120 пациентов с деменцией Альцгеймеровского типа и деменциями, связанными с другими нейропатологиями. Во всех случаях на протяжении более 2-х лет наблюдений обнаружено повышение Cer и DHCer, связанное со значительным развитием деменции. В противоположность этому у пациентов, в плазме которых наблюдался повышенный уровень SM и DHSM, а также отношения SM/Cer и DHSM/DHCer, развитие деменции происходило более медленно. В этой же работе показано, что изменения в уровне холестерина и триглицеридов не связано со скоростью развития деменции. Эти результаты позволяют предположить, что повышение отношения SM/Cer и DHSM/DHCer в плазме крови пациентов может служить маркером для предсказания скорости развития БА.

Аналогичные данные получены в работе [107] при анализе липидов плазмы крови методом масс-спектрометрии у 26 пациентов с БА и 26 пожилых людей с нормальными когнитивными функциями. Из 33 сфингомиелинов 8 молекулярных видов, содержащих жирнокислотные алифатические цепи из 22 и 24 атомов углерода, были значительно ниже у пациентов с БА по сравнению с контролем. Уровень 2 молекулярных видов церамидов (16:0 и 21:0), напротив, были значительно выше в плазме крови с БА,

остальные 5 церамидов повышались незначительно. Отношение церамидов к сфингомиелинам, содержащих идентичные жирные кислоты у пациентов с БА, резко отличалось от нормального контроля. Эти изменения отражали как нарушения в когнитивных функциях пациентов, так и в генотипе (при диагнозе определяли наличие генотипа по апополипротеину Е4).

Кроме возможности использования сфинголипидов для тестирования развития БА, они были бы полезны для мониторинга эффективности лечения каждого индивидуального пациента определённым лекарственным средством. Это особенно важно, если пациент получает новые лекарства или новые лекарства исследуются на предклинической или ранней клинической стадии.

11. ВЛИЯНИЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРОВ НА СОДЕРЖАНИЕ И СПЕКТР МОЛЕКУЛЯРНЫХ ВИДОВ СФИНГОМИЕЛИНОВ И ФОСФАТИДИЛХОЛИНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ В ПРОЦЕССЕ ЛЕЧЕНИЯ БА.

В настоящее время в клинической практике наиболее широко применяемыми препаратами для лечения БА являются Акатинол мемантин (фирмы “Merz”) и ривастигмин (фирмы “Novartis”). Ривастигмин – ингибитор ацетилхолинэстеразы (АХЭ) (КФ 3.1.1.7) – фермента, функция которого резко повышена при БА, а акатинол мемантин – ингибитор глутаматергической системы, функция которой также нарушается в ходе развития этого заболевания [1]. Однако изучение влияния этих препаратов на липидный метаболизм и возможной коррекции его нарушений в процессе лечения не проводилось.

Нами впервые было исследовано влияние ривастигмина и акатинола мемантина на содержание и молекулярный спектр фосфолипидов, которые в своём составе содержат холиновую группировку (сфингомиелины, фосфатидилхолины, лизофосфатидилхолины) [108]. Нарушения в метаболизме этих фосфолипидов может влиять на холинергическую систему за счёт изменения баланса холина и лиганд-рецепторного взаимодействия, определяемого структурированностью мембран клеток нервной системы. Используя метод хромато-масс-спектрометрии мы определили какие именно молекулярные виды холинсодержащих фосфолипидов (различия молекулярных видов фосфолипидов определяются набором жирных кислот, входящих в их состав) особенно активно подвергаются действию изучаемых ингибиторов [108].

Ривастигмин применяется в клинике для лечения БА на этапе мягкой и умеренной деменции. Акатинол мемантин, нормализуя мембранный потенциал, активирует процесс передачи нервного импульса, что приводит к улучшению когнитивных процессов, памяти и способности к обучению, повышает повседневную активность [1]. Перечисленные выше свойства мемантина указывают на его возможную способность оказывать модулирующее действие на компоненты мембран клеток головного мозга, в том числе и на липидные структуры.

Исследование фосфолипидных спектров методом масс-спектрометрии плазмы крови пациентов с БА средней тяжести до и после лечения ривастигмином и мемантином по истечении 3 и 6 месяцев соответственно с начала курса терапии показало, что препараты снижают уровень всех изученных фосфолипидов в плазме крови [108].

При детектировании по молекулярным массам отдельных типов фосфолипидов была обнаружена избирательность действия препаратов на определенные молекулярные виды тех или иных фосфолипидов. Очень

заметно дифференцированное влияние ривастигмина и акатинола мемантина на фосфатидилхолина (ФХ) с различным набором жирных кислот.

Наиболее чёткие изменения при действии ривастигмина, выраженные в уменьшении содержания, зафиксированы для ФХ с набором жирных кислот 16:0/18:2, 18:1/20:2 и 18:0/20:4, соответствующие молекулярным массам 758,6, 808,6 и 810,6. При действии мемантина наибольшие изменения происходили во фракции ФХ с жирными кислотами 16:0/18:2, 18:0/18:2, 18:0/20:4 (рис. 2). Также в ходе лечения уменьшается уровень всех лизофосфатидилхолинов (рис. 3). Сфингомиелины с жирными кислотами 16:1, 16:0, 18:3 и 18:0 проявляют тенденцию к снижению. Наибольшие изменения зафиксированы для SM 16:0 с молекулярной массой 703,6 (рис. 4).

Следовательно, наши результаты указывают на то, что ингибитор АХЭ, влияя на фермент-мишень, в конечном счёте способен модифицировать фосфолипидный спектр плазмы крови пациентов в процессе лечения. Под влиянием этого ингибитора происходит снижение уровня холинсодержащих фосфолипидов. Это вполне закономерное явление, поскольку в результате действия ривастигмина снижается уровень свободного холина [108], являющегося структурным элементом изученных нами фосфолипидов. Ацетилхолин, который не расщепляется до холина и уксусной кислоты в присутствии ривастигмина, напротив, накапливается. Однако он не может быть непосредственно включён в тот метаболический путь синтеза фосфолипидов, в котором участвует свободный холин, что, вероятно, приводит к снижению синтеза холинсодержащих фосфолипидов (схема). Однако до сих пор при изучении ингибиторов холинэстеразного ряда не уделялось внимания их влиянию на метаболизм сфингомиелина, хотя именно этот холинсодержащий фосфолипид является источником проапоптотических агентов, вызывающих гибель нейронов.

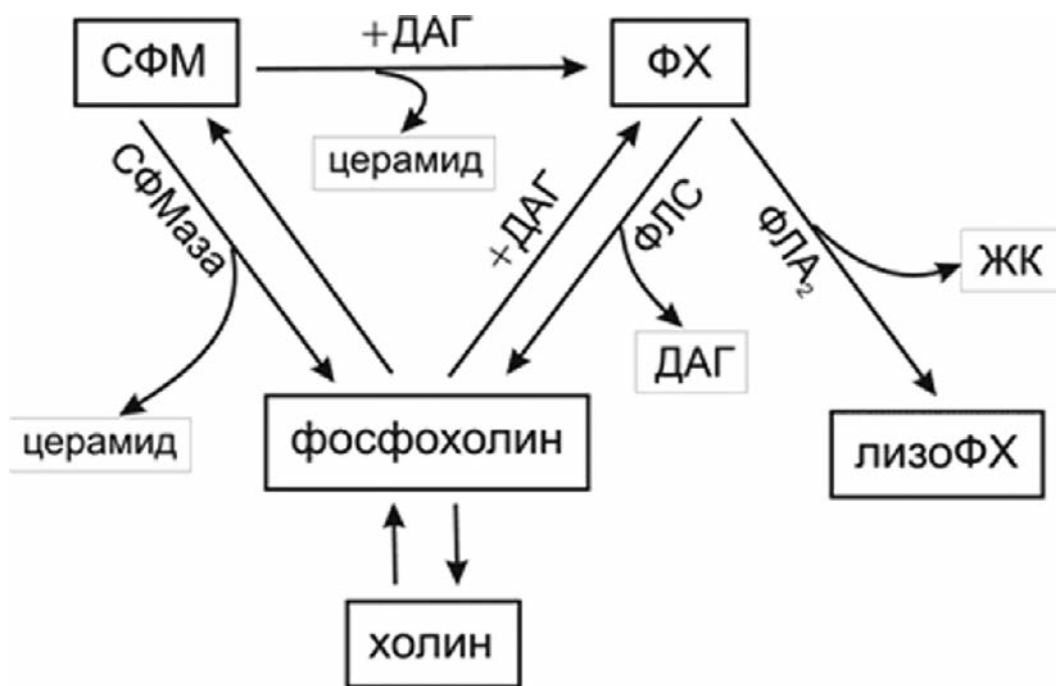


Схема.

Пересечение метаболических путей холина, фосфатидилхолина, лизофосфатидилхолина и сфингомиелина.

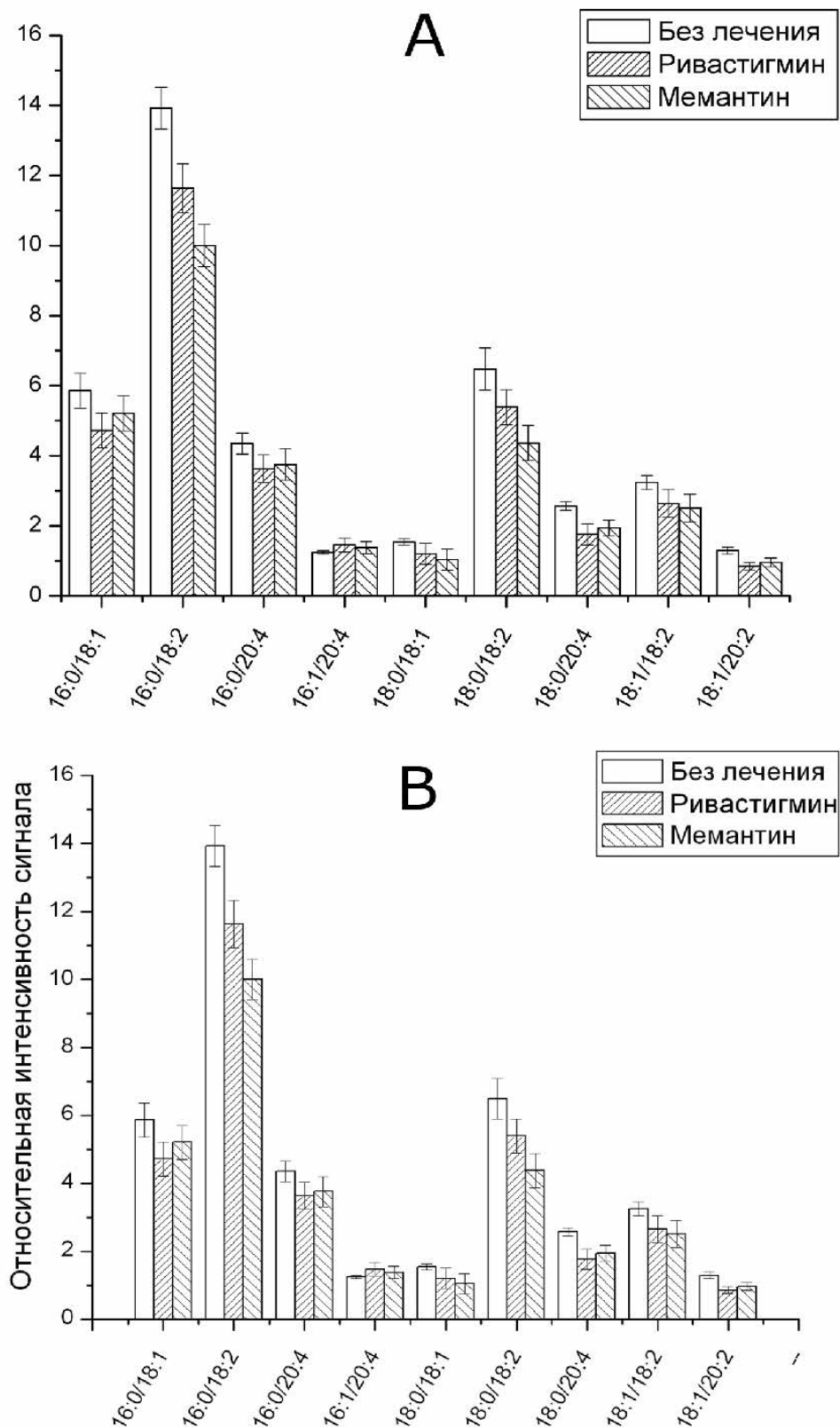


Рисунок 2.

Изменение содержания молекулярных видов ФХ в плазме крови пациентов с болезнью Альцгеймера до (А) и после (В) лечения ривастигмином и мемантином.

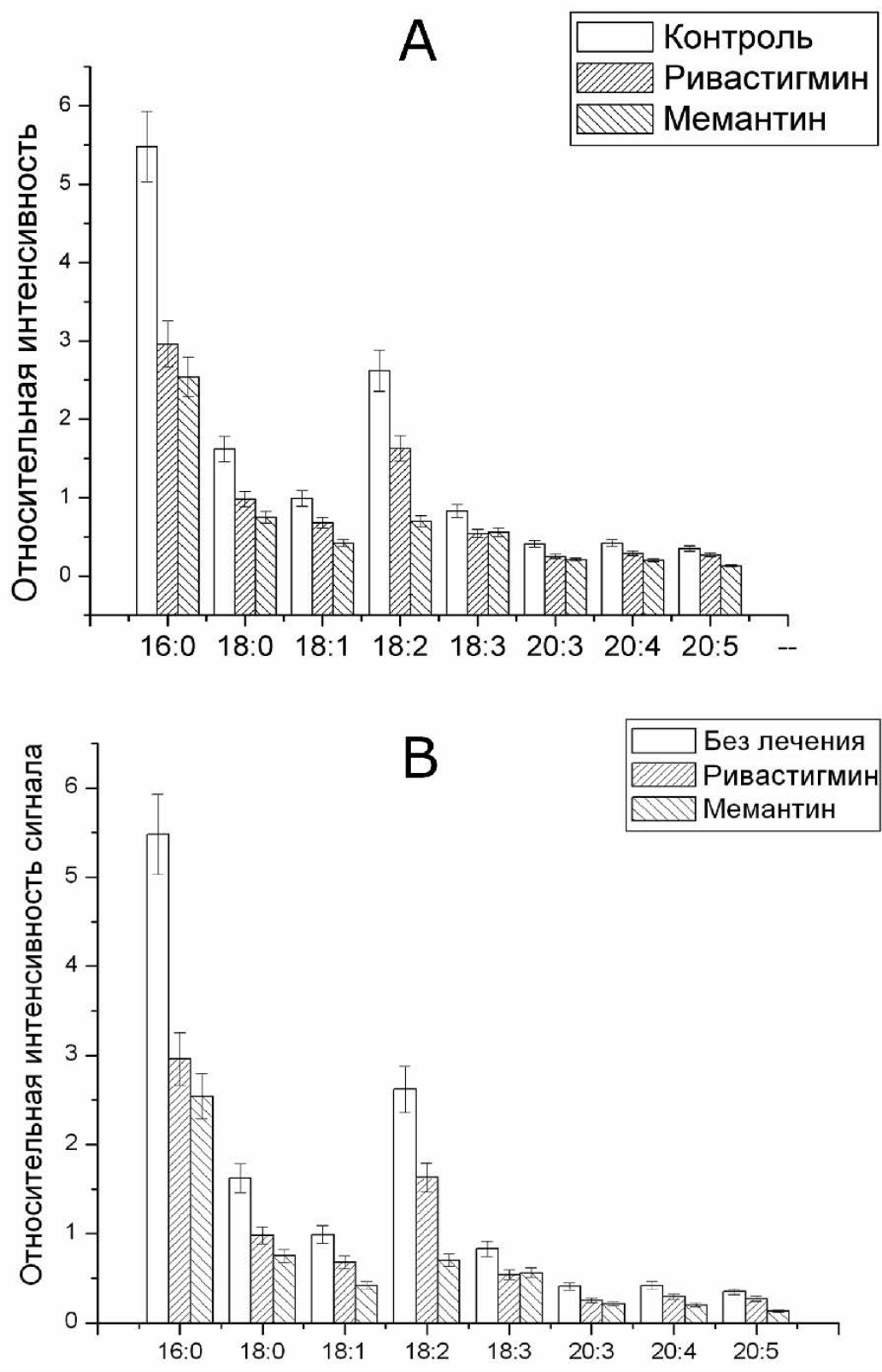


Рисунок 3.

Изменение содержания молекулярных видов ЛФХ в плазме крови пациентов с болезнью Альцгеймера до (А) и после (В) лечения ривастигином и мемантином.

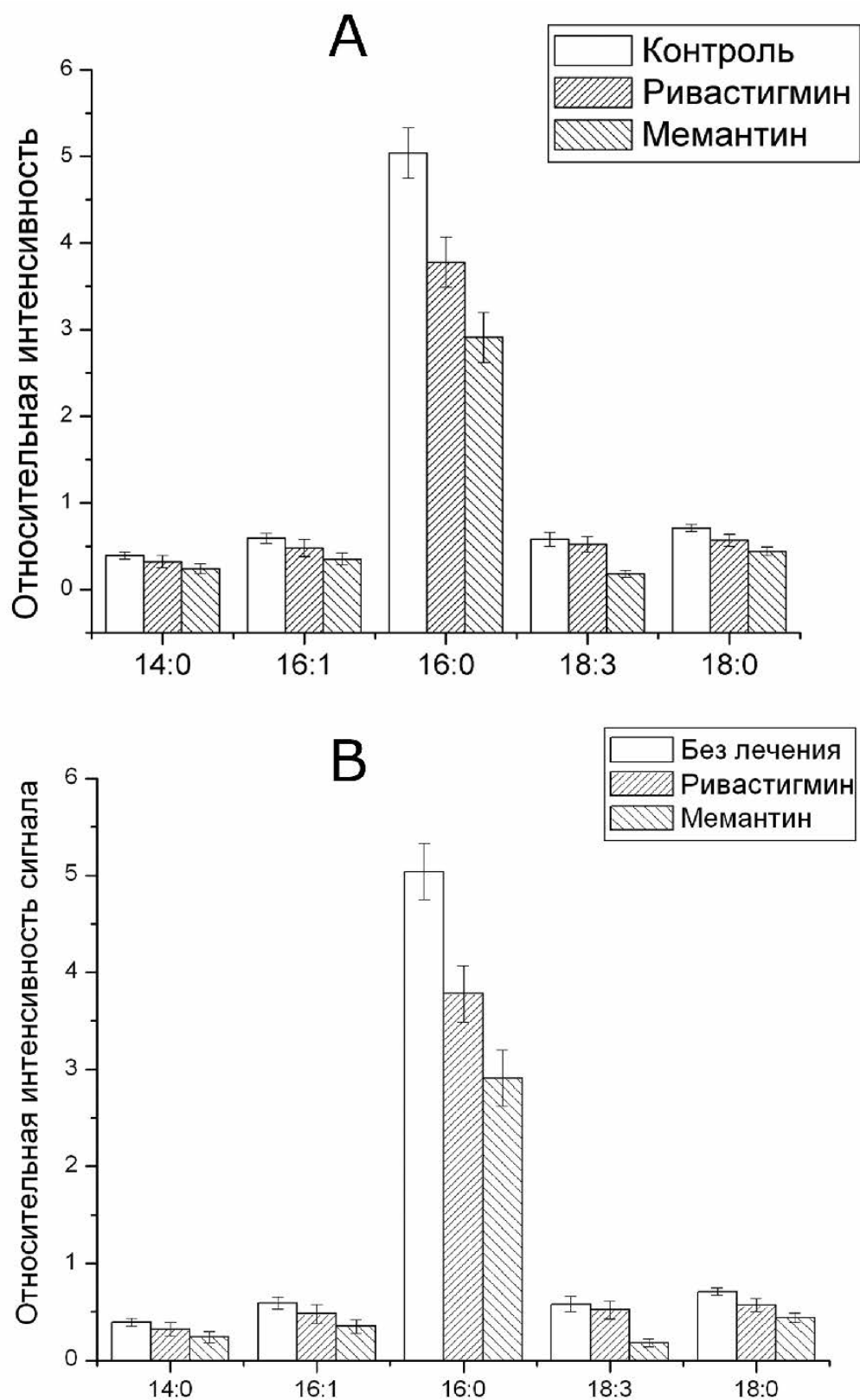


Рисунок 4.

Изменение содержания молекулярных видов СФМ в плазме крови пациентов с болезнью Альцгеймера до (А) и после (В) лечения ривастигином и мемантином.

Общность картины при действии ривастигмина и акатинола мемантина на спектр холинсодержащих липидов заключалась в том, что не было обнаружено однообразия в изменении содержания всех детектируемых молекул фосфолипидов. Содержание некоторых из них остается неизменным, в то время как в определённом виде фосфолипидных молекул отмечается заметное снижение их содержания в плазме после лечения мемантином [108].

Под действием этих двух препаратов с различными свойствами характер изменений фосфолипидов носит однонаправленный характер. Следует подчеркнуть, что нами впервые выявлено влияние ингибитора АХЭ на изменение уровня сфингомиелина в липидах крови пациентов с БА [108]. Также впервые мы обнаружили новое важное свойство препаратов, используемых в клинике для лечения БА. Возможно, что их способность влиять на липидный обмен вносит существенную роль в эффективность терапии, проводимой данными препаратами [108].

Как показывает клиническая практика, наиболее эффективными являются те препараты, которые способны действовать на несколько мишеней. И это вполне логично, так как нейродегенеративные заболевания, к которым относится БА, имеют многофакторный характер и определяются множественностью патогенетических факторов, которые должны подвергнуться коррекции в случае успешного лечения заболевания. Нарушения в липидном метаболизме обнаруживаются при многих патологиях, поскольку структура мембраны клетки, а также процессы, происходящие на её поверхности, определяются липидной составляющей мембраны. Следовательно, если препараты наряду с другими функциями способны вызывать коррекцию в липидном метаболизме, то они могут рассматриваться как наиболее перспективные при лечении нейродегенераций, в том числе и альцгеймеровского типа.

Тестирование липидного спектра методом масс-спектрометрии может отражать успешность лечения указанным препаратом и в дальнейшем этот метод в виду его широких возможностей по определению различных классов липидов может быть внедрен в клиническую практику для мониторинга эффективности лечения любых нейродегенеративных заболеваний, патогенез которых связан с нарушением липидного обмена, а также для отбора наиболее эффективных нейропротекторов нового поколения, корректирующих липидный метаболизм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. БА является наиболее частой причиной слабоумия, развивающегося у лиц пожилого и старческого возраста. По данным ВОЗ, к 2040 г. в мире этим заболеванием будет страдать более 80 млн человек [1]. Несмотря на значительные усилия мирового сообщества до сих пор не установлен точный механизм БА. В последние два десятилетия для его расшифровки всё большую актуальность приобретают сфинголипиды клеток мозга, участвующие в процессинге и агрегации β A и в проведении цитотоксического сигнала, индуцируемого β A и провоспалительным цитокином ФНО- α , которые рассматриваются в качестве основных индукторов нейродегенерации Альцгеймеровского типа. При исследовании сфинголипидного метаболизма в процессе развития БА в структурах мозга животных и человека, в спинномозговой жидкости, в сыворотке и плазме крови пациентов с БА стало очевидно, что такие относительно простые сфинголипиды как церамид, сфингозин, сфингозин-1-фосфат и гликозилцерамид играют решающую роль в нейрональной функции благодаря регулированию скорости роста, дифференцировки и смерти клеток ЦНС.

Активация SMase, приводящая к накоплению проапоптотического агента – церамида, может рассматриваться в качестве нового механизма БА, что может служить предпосылкой для терапии этого заболевания путем использования препаратов нового поколения, ингибирующих активность сфингомиелиназы. В связи с этим чрезвычайно важным является исследование изменений спектра сфинголипидов в клетках мозга животных, у которых моделируется БА, и в крови пациентов, страдающих БА, в ходе развития заболевания и его лечения. Особое значение приобретает точный и информативный метод анализа липидного спектра, которым является масс-спектрометрия, позволяющая однозначно, быстро и в большом количестве проб с минимальным объемом исследуемого материала дать характеристику сложного спектра разнообразных липидных компонентов биологического материала. Применение этого метода позволило установить, что сфинголипиды могут быть диагностическими маркерами ранней стадии БА, на которой ещё возможна медикаментозная коррекция заболевания, а также их анализ в ходе лечения позволяет определить его эффективность.

Работа поддержана грантом Программы Президиума РАН “Фундаментальные науки – медицине”

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилова С.И. (2007) Фармакотерапия болезни Альцгеймера. Пульс, Москва.
2. Selkoe D.J. (1994) Annu. Rev. Cell. Biol., **10**, 373-403.
3. Mielke M., Lyketsos G. (2010) Neuromolecular Med. **12**, 331-340.
4. Haughey N.J., Bandaru V.R., Bai M., Mattson M.P. (2010) Biochim. Biophys. Acta, **1801**, 878-886.
5. Merrill A.H. (2002) J. Biol. Chem. **277**, 25843–25846.
6. Hannun Y.A., Obeid L.M. (2008) Nature Reviews Molecular Cell Biology, **9**, 139–150.
7. Pruett S.T., Bushnev A., Hagedorn K. (2008) J. Lipid Res., **49**, 1621–1639.
8. Pettus B.J., Chalfant C.E., Hannun Y.A. (2002) Biochim. Biophys. Acta, **1585**, 114–125.
9. Buccoliero R., Futerman A.H. (2003) Pharmacological Res., **47**, 409–419.
10. Mao C., Obeid L.V. (2008) Biochim. Biophys. Acta, **1781**, 424-434.
11. Hakomori S. (2003) Curr. Opin. Hematol., **10**, 16-24.
12. Bielawska A., Crane H.M., Liotta D., Obeid L.M., Hannun Y.A. (1993) J. Biol. Chem., **268**, 26226-26232.
13. Alessenko A.V. (2006) in: New research on Alzheimer’s disease (Welsh E.M., ed), pp. 168-189.
14. Gatt S. (1963) J. Biol. Chem., **238**, 3131-3133.
15. Horres C.R., Hannun Y.A. (2012) Neurochem. Res. Jan 12. (Epub. ahead of print).
16. Spence M.W., Byers D.M., Palmer F.B., Cook H.W. (1989) J. Biol. Chem., **264**, 5358-5363.
17. Nilsson A. (1969) Biochim. Biophys. Acta, **176**, 339-347.
18. Duan R.D. (2006) Biochim. Biophys. Acta, **1761**, 281-291.
19. Hofmann K., Tomiuk S., Wolff G., Stoffel W. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, 5895-5900.

20. *Levy M., Castillo S., Goldcorn T.* (2006) *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, **344**, 900-905.
21. *Krut O., Wiegmann K., Kashkar H., Yazdanpahan B., Kronke M.* (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 13784-13793.
22. *Huitema K., van den Dikkenberg J., Brouwers J.F., Holthuis J.C.* (2004) *Embo J.*, **23**, 33-44.
23. *Taffese F.G., Huitema K., Hermansson M., van der Poel S., van den Dikkenberg J., Uphoff A., Somerharju P., Holthuis J.C.* (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 17537-17547.
24. *Maceyka M., Harikumar K.B., Milstein S., Spiegel S.* (2012) *Trends Cell Biol.*, **22**, 50-60.
25. *Paul P., Kamisaka Y., Marks D.L., Pagano R.E.* (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 2287-2293.
26. *Seyfried T.N., Yu R.K.* (1984) *Adv. Exp. Med. Biol.*, **174**, 169-181.
27. *Palestini P., Masserini M., Fiorilli A., Calappi E., Tettamanti G.* (1993) *J. Neurochemistry*, **61**, 955-960.
28. *Sullards M.C., Wang E., Peng Q., Merrill A.H.Jr.* (2005) in: *Functional Lipidomics*, (Feng L., Prestwich G.D., eds.). Echelon Biosciences, Salt Lake City, pp. 159-189.
29. *Sullards M.C., Wang E., Peng Q., Merrill A.H.Jr.* (2003) *Cell Mol. Biol.*, **49**, 789-797.
30. *Sullard M.C.* (2000) *Methods Enzymol.*, **312**, 32-45.
31. *Merrill A.H., Sullards M.C., Allegood J.C., Kelly S., Wang E.* (2005) *Methods*, **36**, 207-224.
32. *Karlsson K.A.* (1965) *Acta Chem. Scand.*, **19**, 2425-2427.
33. *Polito A.J., Akita T., Sweeley C.C.* (1968) *Biochemistry*, **7**, 2609-2614.
34. *Sugiyama E., Hara A., Uemura K., Taketomi T.* (1997) *Glycobiology*, **7**, 719-724.
35. *Hunnam V., Harvey D.J., Priestman D.A., Bateman R.H., Bordoli R.S., Tyllesley R.J.* (2001) *Am. Soc. Mass Spec.*, **12**, 1220-1225.
36. *Suzuki M., Suzuki A.* (2001) *J. Biol. Chem.*, **382**, 251-257.
37. *O'Connor P.B., Budnik B.A., Ivleva V.B., Kaur P., Moyer S.C., Pittman J.L., Costello C.E.* (2004) *J. Am. Soc. Mass Spec.*, **15**, 128-132.
38. *Sugiura Y., Shimma S., Konishi Y., Yamada M.K., Setou M.* (2008) *PLoS ONE*, **3**(9), e3232.
39. *Adams, J., Ann Q.* (1993) *Mass. Spectrom. Rev.*, **12**, 51-85.
40. *Houjou T., Yamatani K., Nakanishi H., Imagawa M., Shinuzu T., Taguch R.* (2004) *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 3123-3130.
41. *Domon B., Vath J.E., Costello C.E.* (1990) *Anal. Biochem.*, **184**, 151-164.
42. *Domon B., Costello C.E.* (1998) *Biochemistry*, **27**, 1534-1543.
43. *Futerman A.N., Hannun Y.A.* (2004) *EMBO*, **5**, 777-782.
44. *Han X., Yang J., Cheng H., Ye H., Gross R.W.* (2004) *Anal. Biochem.*, **330**, 317-331.
45. *Han X., Yang K., Cheng H., Fikes K.N., Gross R.W.* (2005) *J. Lipid Res.*, **46**, 1548-1560.
46. *Masters C.L., Simms G., Weinman N.F., Multhaup G., McDonald B.L., Beyreuther K.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4245-4249.
47. *Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V., Rowan M.J., Selkoe D.J.* (2002) *Biochem. Soc. Trans.*, **30**, 552-557.
48. *Eckert G.P., Cairns N.J., Maras A., Gattas W.F., Muller W.E.* (2000) *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.*, **11**, 181-186.

49. Choo-Smith L.P., Surewicz W.K. (1997) FEBS Lett., **402**, 95-98.
50. Agira T., McDonald M.P., Yu R.K. (2008) J. Lipid Res., **49**, 1157-1175.
51. Yanagisawa K. (2007) Biochim. Biophys. Acta, **1768**, 1943-1951.
52. Mahfoud R., Garmy N., Maresca M., Yahi N., Puigserver A., Fantini J. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 11292-11296.
53. Yanagisawa K., Odaka A., Suzuki N., Ihara Y. (1995) Nat. Med., **1**, 1062-1066.
54. Fantini J., Garmy N., Mahfoud R., Yahi N. (2002) Exper. Rev. Mol. Med., **4**, 1-22.
55. Vetrivel K.S., Thinakaran G. (2010) Biochim. Biophys. Acta, **1801**, 860-867.
56. Soderberg M., Edlund C., Alafuzoff I., Kristensson K., Dallner G. (1992) J. Neurochem., **59**, 1646-1653.
57. Shepardson N.E., Shankar G.M., Selkoe D.J. (2011) Arch. Neurol., **68**, 1385-1392.
58. Cutler R.G., Kelly J., Storie K., Pedersen W.A., Tammara A., Hatanpaa K. et al. (2004) PNAS, **101**, 2070-2075.
59. He X., Huang Y., Li B., Gong C.X., Schuchman E.H. (2010) Neurobiology of Aging, **31**, 398-408.
60. Bornemann K.D., Staufenbiel M. (2007) Ann. NY Acad. Sci., **908**, 260-266.
61. Benedikz E., Kloskowska E., Winblad B. (2009) J. Cell Mol. Med. **13**, 1034-1042.
62. Stepanichev M.Y., Moiseeva Y.V., Lazareva N.A., Gulyaeva N.V. (2005) Neurosci. Behav. Physiol., **35**, 511-518.
63. Островская Р.У., Бельник А.П., Сторожева З.И. (2008) Бюлл. Экспер. Биол. Мед., **146**, 84-88.
64. Alessenko A.V., Bugrova A.E., Dudnik L.B. (2004) Biochem. Soc. Transaction, **32**, 144-146.
65. Нестерова И.В., Бобкова Н.В., Медвинская Н.И., Самохин А.Н., Александрова И. (2007) Морфология, **131**, 32-36.
66. Barrier L., Ingard S., Fauconneau B., Hage G. (2010) Neurobiol. Aging, **31**, 1843-1853.
67. de Chaves E.P., Bussiere M., MacInnis B., Vance D.E., Campeton R.B., Vance J.E. (2001) J. Biol. Chem., **276**, 36207-36217.
68. Obeid L.M., Lenardic C.M., Karolak L.A., Hannun Y.A. (1993) Science, **259**, 1769-1771.
69. Lee J-T., Xu J., Ku G., Han X., Yang D-I., Chen S., Buccoliero R., Futterman A.H. (2003), Pharmacological Res., **47**, 409-419.
70. Beal M.F. (2005) Ann. Neurol., **58**, 495-505.
71. Yanagisawa K. (2007) Biochim. Biophys. Acta, **1768**, 1943-1951.
72. Ariga T., Yanagisawa M., Wakade C., Ando S., Buccafusco J., McDonald M.P., Yu R.K. (2010) ASN Neuro., **2**(4):e00044.
73. Jana A., Pahan K. (2010) J. Neuroscience, **30**, 12676-12689.
74. Lee J-T., Xu J., Lee J-M., Ku G., Han X., Yang D-I., Chen S., Hsu C.Y. (2004) J. Cell Biol., **164**, 123-131.
75. Yang D-I., Yeh C-H., Chen S., Xu J., Hsu C.Y. (2004) Neurobiol. Dis., **17**, 99-107.
76. Malaplate-Armand C., Florent-Bécharde S., Youssef I., Koziel V., Sponne I., Kriem B., Leininger-Muller B., Olivier J.L., Oster T., Pillot T. (2006) Neurobiol. Dis., **23**(1), 178-189.
77. Xuan N.T., Shumilina E., Kempe D.S., Gulbins E., Lang F. (2010) J. Neuroimmunol., **219**, 81-89.
78. Zeng C., Lee J.T., Chen S., Hsu C.Y., Xu J. (2005) J. Neurochem., **94**, 703-712.

79. *Chen S., Lee J.M., Zeng C., Chen H., Hsu C.Y., Xu J.* (2006) *J. Neurochem.*, **97**, 631-640.
80. *Malaplate-Armand C., Florent-Bécharde S., Youssef I., Koziel V., Sponne I., Kriem B., Leininger-Muller D., Olivier J-L., Jster T., Pillot T.* (2006) *Neurobiol. Dis.*, **23**, 178-189.
81. *He X., Huang Y., Li B., Schuchman E.H.* (2010) *Neurobiol. Aging*, **31**, 398-408.
82. *Fillipov V., Song M.A., Zhang K., Vinters H.V., Tung S., Kirsh W.M., Yang J., Duerksen-Hughes P.J.* (2012) *J. Alzheimers Dis.*, **29**, 537-547.
83. *Pettegrew J.W., Panchalingham K., Hamilton R.L., McClure R.J.* (2001) *Neurochemical Research*, **26**, 771, 782.
84. *Chan R.B., Oliveira T.G., Cortes E.P., Honig L.S., Duff K.E., Small S.A., Wenk M.R., Shui G., Di Paolo G.* (2012) *J. Biol. Chem.*, **287**, 2678-2688.
85. *Bandaru V.V., Troncoso J., Wheeler D., Pletnikova O., Wang J., Connant K.* (2009) *Neurobiology of Aging*, **30**, 591-599.
86. *Han X., Holtzman D., McKeel D.W. Jr., Kelly J., Morris J.C.* (2002) *J. Neurochemistry*, **82**, 809-818.
87. *Jana A., Hogan E.L., Pahan K.* (2009) *J. Neurol. Sci.*, **278**(1-2), 5-15.
88. *Jana A., Pahan K.* (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 51451-51459.
89. *Lee J-T., Xu J., Ku G., Han X., Yang D-I., Chen S., Hs C.Y.* (2004) *J. Cell Biol.*, **164**, 123-131.
90. *Shupik M.A., Vanin A.F., Alessenko A.V.* (2011) *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1197-1209.
91. *Dobrowsky R.T., Werner M.H., Castellino A.M., Cao M.V., Hannun Y.A.* (1994) *Science*, **265**, 1596-1599.
92. *Yu Z.F., Nikolaeva-Karakashian M., Zhou D., Cheng G., Schuchman E.H., Mattson M.P.* (2000) *J. Mol. Neurosci.*, **15**, 85-97.
93. *Reddy P.H.* (2009) *CNS Spectr.*, **14**, 8-18.
94. *Gottfries C.G., Karkson I., Svennerholm L.* (1996) *Int. Psychogeriatr.*, **8**, 365-372.
95. *Zhang S.C., Duncan I.D.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4086-4094.
96. *Katsel P., Li C., Haroutunian V.* (2007) *Neurochem. Res.*, **32**, 845-856.
97. *Arenc C.* (2010) *Cell. Physiol. Biochem.*, **26**, 1-8.
98. *Kornburger J., Tripal P., Reichel M., Muhle C., Rhein, C., Muehbacher M., Groemer T.W., Gulbins E.* (2010) *Cell. Physiol. Biochem.*, **26**, 9-20.
99. *Taguchi M., Sugimoto K., Akama T., Yamamoto K., Suzuki T., Tomishima Y., Nishiguchi M., Arai K., Takanashi K., Kobori T.* (2003) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 1963-1966.
100. *Huang Y., Tanimukai H., Liu F., Iqbal K., Grundke-Iqbal I., Gong C.X.* (2004) *Eur. J. Neurosci.*, **20**, 3489-3497.
101. *Park J.H., Schuchman E.H.* (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 2133-2138.
102. *Han X., Fagan A.M., Cheng H., Morris J.C., Xiong C., Holtzman D.M.* (2003) *Ann. Neurol.*, **54**, 115-119.
103. *Satoi H., Tomimoto H., Ohtani R., Kitano T., Kondo T., Watanabe M. et al.* (2005) *Neuroscience*, **130**, 657-666.
104. *Mielke M.M., Haughey N.J., Bandaru V.V., Weinberg D.D., Darby E., Zaidi N., Pavlik V.* (2011) *J. Alzheimer's Dis.*, **27**, 259-269.
105. *Kosicek M., Zetterberg H., Andreasen N., Peter-Katalinic J., Hecimovic S.* (2012) *Neurosci. Lett.*, **516**(2), 302-305.
106. *Mielke M.M., Hauhey N.J., Bandaru V.V., Schech S., Carrick R., Carlson M.C., Mori S., Miller M.I., Ceritoglu C., Brown T., Albert M., Lyketsos C.G.* (2010) *Alzheimers Dement.*, **6**, 378-385.

107. *Han X., Rozen S., Boyle S.H., Hellegers C., Cheng H., Burke J.R., Welsh-Bohmer K.A., Doraiswamy P.M., Kaddurah-Dauk R. (2011) PLoS One, 6(7), e21643.*
108. *Каратасо Ю.О., Суллард К., Федорова Я.Б., Коротаева А.А., Гаврилова С.С., Варфоломеев С.Д., Алесенко А.В. (2008) Масс-спектрометрия, 5, 106-116.*

Поступила: 16. 05. 2012.

THE POTENTIAL ROLE FOR SPHINGOLIPIDS IN NEUROPATHOGENESIS
OF ALZHEIMER'S DISEASE

A.V. Alesenko

N.M. Emanuel Institute of Biochemical Physics of the Russian Academy of Sciences,
ul. Kosygina, 4, Moscow, 199334 Russia; fax: 7(499)137-41-01; e-mail: ales@sky.chph.ras.ru

The review discusses the functional role of sphingolipids in the pathogenesis of Alzheimer's disease. Certain evidence exist that the imbalance of sphingolipids such as sphingomyelin, ceramide, sphingosine, sphingosine-1-phosphate and galactosylceramide in the brain of animals and humans, in the cerebrospinal fluid and blood plasma of patients with Alzheimer's disease play a crucial role in neuronal function by regulating growth, differentiation and cell death in CNS. Activation of sphingomyelinase, which leads to the accumulation of the proapoptotic agent, ceramide, can be considered as a new mechanism for AD and may be a prerequisite for the treatment of this disease by using drugs that inhibit sphingomyelinase activity. The role of sphingolipids as biomarkers for the diagnosis of the early stage of Alzheimer's disease and monitoring the effectiveness of treatment with new drugs is discussed.

Key words: Alzheimer's disease, sphingolipids (sphingomyelin, ceramide, sphingosine, sphingosine-1-phosphate, sulphatides), mass spectrometry of sphingolipids, brain, cerebrospinal fluid, blood plasma, biomarkers.