

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Луговая А. В.¹, Эмануэль В.С.¹, Калинина Н.М.,^{1,2} Иванов А.М.³, Артемова А.В.¹

АПОПТОЗ И АУТОФАГИЯ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТРОГО ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

¹ ФГБОУ ВО Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова МЗ РФ, 197022, Санкт-Петербург, Россия;

² ФГБУ Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины имени А.М. Никифорова МЧС МЗ РФ, 194044, Санкт-Петербург, Россия;

³ ФГБВОУ ВО Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова МО РФ, 194044, Санкт-Петербург, Россия

По данным Всемирной организации здравоохранения ежегодно от цереброваскулярных заболеваний умирает около 5 млн человек. При этом удельный вес инфаркта головного мозга, или ишемического инсульта (ИИ), среди форм острого нарушения мозгового кровообращения достигает 80–85%. Несмотря на активное изучение биохимических и морфологических изменений, приводящих к острой цереброваскулярной ишемии, проблема ранней диагностики, профилактики, а также прогнозирования исхода данного заболевания по-прежнему актуальна. Не вызывает сомнений тот факт, что прерывание ишемического каскада на более ранних этапах может сопровождаться большим эффектом от лечения. Для своевременного и эффективного фармакологического вмешательства требуется четкое понимание патохимических и биологических процессов, лежащих в основе острой ишемии, на молекулярном уровне. Высокая смертность и инвалидизация, сопровождающие острый ИИ, диктуют необходимость создания новых алгоритмов диагностики и прогноза как в остром периоде ИИ, так и в период восстановления. По мнению ряда авторов, выяснение путей, которые лежат в основе патогенетических механизмов, действующих в пенеумбре, имеют большой клинический интерес для разработки новых диагностических и терапевтических стратегий. Изучение механизмов апоптоза и аутофагии нейронов в динамике острого периода ИИ, модуляция процесса аутофагии в зоне пенеумбры может способствовать разработке новых методов диагностики и лечения острого ИИ. В обзоре представлены результаты новейших экспериментальных исследований, посвященных изучению роли апоптоза и аутофагии в развитии острой ишемии головного мозга и попыткам модуляции этих процессов с целью воздействия на ишемический каскад. При подготовке обзора использовались источники литературы, полученные из международных и отечественных баз данных: Scopus, Web of Science, Springer, РИНЦ.

Ключевые слова: апоптоз; аутофагия; аутофагосома; острый ишемический инсульт; индукторы апоптоза; ингибиторы апоптоза; p53; Bcl-2; биомаркеры аутофагии; Beclin 1; LC3; p62; обзор литературы.

Для цитирования: Луговая А. В., Эмануэль В.С., Калинина Н.М., Иванов А.М., Артемова А.В. Апоптоз и аутофагия в патогенезе острого ишемического инсульта (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (7): 428-434. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-7-428-434>

Lugovaya A.V.¹, Emanuel V.S.¹, Kalinina N.M.^{1,2}, Ivanov A.M.³, Artemova A.V.¹

APOPTOSIS AND AUTOPHAGY IN THE PATHOGENESIS OF ACUTE ISCHEMIC STROKE (REVIEW OF LITERATURE)

¹Academician I.P. Pavlov First St Petersburg State Medical University of the Ministry Healthcare of the Russian Federation, 197022, Saint Petersburg, Russian Federation;

²Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, 194044, Saint Petersburg, Russian Federation;

³S.M. Kirov Military Medical Academy of the Russian Defense Ministry, 194044, Saint Petersburg, Russian Federation

According to the World Health Organization, about 5 million people die every year from cerebrovascular disease. At the same time, the proportion of cerebral infarction, or ischemic stroke (IS), among forms of acute cerebrovascular disease reaches 80–85%. Despite the active study of biochemical and morphological changes leading to acute cerebrovascular ischemia, the problem of early diagnosis, prevention, as well as predicting the outcome of this disease is still relevant. There is no doubt that the interruption of the ischemic cascade at earlier stages can be accompanied by a greater effect of treatment. A timely and effective pharmacological intervention requires a clear understanding of the pathochemical and biological processes underlying acute ischemia at the molecular level. High mortality and disability accompanying acute IS, dictate the need to create new diagnostic and prognosis algorithms both in the acute period of IS, and in the recovery period. According to some authors, elucidation of the pathways that underlie the pathogenetic mechanisms acting in the penumbra are of great clinical interest for the development of new diagnostic and therapeutic strategies. Studying the mechanisms of apoptosis and autophagy of neurons in the dynamics of the acute period of IS, modulation of the autophagy process in the penumbra zone can contribute to the development of new methods for the diagnosis and treatment of acute IS. The review presents the results of the latest experimental studies on the role of apoptosis and autophagy in the development of acute cerebral ischemia and attempts to modulate these processes in order to influence the ischemic cascade. The review was based on sources from such international and national data bases as Scopus, Web of Science, Springer, RINC.

Key words: apoptosis; autophagy; autophagosome; acute ischemic stroke; apoptosis inducers; apoptosis inhibitors; p53; Bcl-2; autophagy biomarkers; Beclin 1; LC3; p62; review.

Для корреспонденции: Луговая Анна Владимировна, канд.мед.наук, врач аллерголог-иммунолог, врач клин. лаб. диагностики отд-ния лаб. диагностики клиники; e-mail: g89213159748@gmail.com

For citation: *Lugovaya A.V., Emanuel V.S., Kalinina N.M., Ivanov A.M., Artemova A.V. Apoptosis and autophagy in the pathogenesis of acute ischemic stroke (review of literature). Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics). 2020; 65 (7): 428-434 (in Russ). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-7-428-434>*

For correspondence: *Lugovaya A.V.*, PhD (Medicine), Allergist-Immunologist, Clinical Laboratory Diagnostition, Department of Clinical Laboratory Diagnostics; e-mail: g89213159748@gmail.com

Information about authors:

Lugovaya A.V., <https://orcid.org/0000-0002-7690-9064>

Emanuel V.S., <https://orcid.org/0000-0002-9938-247X>

Kalinina N.M., <https://orcid.org/0000-0003-1752-6888>

Ivanov.A.M., <https://orcid.org/0000-0002-8899-7524>

Artemova A.V., <https://orcid.org/0000-0002-1793-3240>

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Conflict of interests. *The authors declare absence of conflict of interests.*

Received 02.04.2020

Accepted 25.04.2020

Актуальность. Острая фокальная ишемия головного мозга, в частности ишемический инсульт (ИИ), является серьезной и актуальной проблемой, что связано с высокими показателями заболеваемости, смертности и инвалидизации [1, 2].

Результаты проведенных за последние годы исследований свидетельствуют о стадийности гемодинамических и метаболических изменений, происходящих в ткани головного мозга на разных этапах недостаточности его кровоснабжения и приводящих к формированию инфаркта мозга. Установлено, что формирование большей части зоны инфаркта заканчивается уже через 3–6 ч с момента появления первых симптомов инсульта, “доформирование” очага продолжается на протяжении 48–72 ч и дольше [2]. Предложена схема последовательных этапов “ишемического каскада” на основе их причинно-следственных связей и значимости для терапии: 1) снижение мозгового кровотока; 2) глутаматная эксайтотоксичность; 3) внутриклеточное накопление кальция; 4) активация внутриклеточных ферментов; 5) повышение синтеза окиси азота и развитие окислительного стресса; 6) экспрессия генов раннего реагирования; 7) отдаленные последствия ишемии (реакция местного воспаления, микрососудистые нарушения, повреждение гематоэнцефалического барьера); 8) программируемая гибель нейронов. Каждый этап каскада может быть своеобразной мишенью для терапевтических воздействий [2, 3].

Биохимические реакции ишемического каскада тесно связаны между собой. Часть из них развивается в течение нескольких часов после ишемической атаки, другие патобиохимические процессы активируются через несколько суток после развития острого ИИ и длятся в течение всей последующей жизни, несмотря на восстановление циркуляции крови [3, 4]. При этом они индуцируют отдаленные последствия ишемии: реакцию генома с включением молекулярных механизмов, вызывающих изменения астро- и микроглиального клеточного пула, локальное воспаление в очаге ишемии, нарушение целостности гематоэнцефалического барьера, аутоиммунные реакции [4, 5].

Информация об изменении мембранных структур во время глутамат-кальциевого каскада определяется картиной перераспределения протеинкиназ на клеточных мембранах и передается посредством внутриклеточных сигнальных систем к ядру, что является сигналом к последовательной активации комплекса генетических программ [1]. Первая волна экспрессии генов касается третичных мессенджеров – генов раннего реагирования и стрес-

совых белков, индуцирующих синтез транскрипционных факторов, кодирующих индукторы окислительного стресса, продукцию провоспалительных цитокинов, молекул межклеточной адгезии и проапоптотических белков. Исходом ишемических каскадных реакций является формирование зоны инфаркта головного мозга, происходящее по механизму некроза, апоптоза и аутофагии [6–8].

Показано, что при острой фокальной ишемии головного мозга в зоне пенумбры преобладает апоптотический механизм гибели нейронов, а в области ишемического ядра происходит значительное снижение уровня АТФ и запускается некротический тип клеточной смерти [1]. К факторам, определяющим механизм гибели нейронов, относятся степень и длительность локальной ишемии, степень зрелости клеток, концентрация внутриклеточного свободного Ca^{2+} , клеточное микроокружение и уровень АТФ, так как апоптоз является энергетически зависимым процессом. Установлено, что апоптотические механизмы гибели нейронов включаются позже некротического каскада (спустя 1–2 ч после острой ишемической атаки), достигают максимальной активности на 2–3-и сутки и запускаются при любых ишемических и травматических повреждениях нервной ткани [3, 8].

С современных позиций апоптоз, аутофагия и некроз являются основными механизмами гибели нейронов при остром ИИ [8, 9]. Особый интерес исследователей вызывает гибель нейронов по механизму аутофагии (программируемой клеточной гибели II типа), усиление которой отмечается после острого ишемического поражения головного мозга [6, 8–11]. В экспериментах установлено, что аутофагия, как и апоптоз, активируется в пенумбре [6, 7]. По мнению ряда авторов, выяснение путей, которые лежат в основе патогенетических механизмов, действующих в пенумбре, и, как было показано, влияющих на распространение аутоиммунного пост-ишемического воспаления, имеют большой клинический интерес для разработки новых терапевтических стратегий [7–9]. Считается, что поврежденные апоптозом и аутофагией нейроны в зоне пенумбры можно восстановить в отличие от нейронов, погибших по механизму некроза, локализуемых в зоне ишемического ядра и не подлежащих регенерации [12]. Поэтому модуляция аутофагического процесса в зоне пенумбры, воздействие на отдельные этапы аутофагии, а также таргетирование конкретных молекул – участников аутофагического потока, задействованных в нейрональной гибели, может способствовать индукции процессов регенерации ней-

ронов и, соответственно, разработке новых методов лечения острого ИИ [10-12].

Апоптоз как механизм гибели нейронов при остром ИИ. Общим для всех дегенеративных процессов в нервной ткани является снижение устойчивости нервных клеток к стимуляторам апоптоза: эксайтоаминокислотам, вирусным белкам, ионам кальция и другим триггерным факторам, способствующим запуску апоптотической программы. Однако цепь событий, приводящих к апоптозу, имеет существенные различия при разных заболеваниях. Следует учитывать способность микроокружения нейронов, главным образом, нейроглии, поддерживать физиологические запросы нейронов для обеспечения их жизнеспособности и полноценной функции [13, 14].

После острого ИИ активация апоптоза нейронов головного мозга реализуется под воздействием эксайтотоксичности, гипоксии, внутриклеточного ацидоза, (особенно при обширном ишемическом поражении ткани головного мозга), избыточной генерации свободных кислородных радикалов, продуктов перекисного окисления липидов, оксида азота, нейротоксинов, повышенной продукции провоспалительных цитокинов в результате развития постшемического нейровоспаления и других токсичных для нейронов веществ, образующихся в ткани мозга [3, 13].

Эксайтотоксичность, являющаяся одним из важнейших звеньев ишемического каскада, может в равной степени приводить как к апоптозу, так и к некроптозу (программируемому некрозу) нейронов головного мозга [3, 15]. Это зависит от интенсивности иницирующего сигнала, а также количественного соотношения и функциональной активности индукторов и ингибиторов каспаз в отдельно взятой клетке [15]. Основной феномена эксайтотоксичности является нарушение проницаемости ионотрофных рецепторов, регулирующих содержание калия, натрия, хлора и кальция во вне- и внутриклеточном пространстве в результате воздействия возбуждающих нейротрансмиттеров – аминокислот глутамата и аспарагиновой кислоты. Результатом активации ионотрофных рецепторов, наиболее часто – рецепторов к N-метил-D-аспартату (NMDA-рецепторы) – является повышенный вход кальция в клетку с последующей стимуляцией протеаз и разрушением клеточных структур [14]. При значительном повышении уровня цитозольного кальция в клетке активируется фермент эндонуклеаза, способный фрагментировать ДНК.

Исследования, проведенные на клеточных культурах нервной ткани, выявили ряд веществ, способных активировать или замедлять развитие апоптоза [13]. Индукция апоптоза может осуществляться при воздействии как внешних, так и внутренних факторов, приводящих к повышению концентрации внутриклеточного кальция, а также к усилению экспрессии генов-активаторов апоптоза [14].

Существенную роль в торможении апоптоза клеток головного мозга играют нейротрофические факторы. Доказано, что NGF (nerve growth factor – фактор роста нервов) тормозит апоптоз при нейродегенеративных заболеваниях [13]. Показано, что при воздействии NGF на культуру клеток крысиной феохромоцитомы PC 12 происходит повышение экспрессия ингибитора апоптоза белка Bcl-2, увеличение степени и скорости дифференцировки олигодендроцитов и клеток глии на фоне уменьшения конденсации хроматина в клеточных ядрах, что выявляется с помощью электронной микроскопии [9, 14]. Аналогичное действие на апоптотический процесс оказывают нейротрофический фактор BDNF (brain derived neurotrophic factor – мозговой нейротрофический

фактор) [7] и IGF-1 (insulin like growth factor – инсулиноподобный фактор роста 1) [16]. В противоположность нейротрофинам провоспалительные цитокины TNF α (фактор некроза опухоли α), IL-1 β (интерлейкин 1 β) и IFN- γ (интерферон- γ) являются индукторами апоптоза и реализуют программу апоптотической гибели нейронов через активацию транскрипционного фактора JNK (с-Jun N-терминальной киназы) и за счет индукции ER-стресса (стресс эндоплазматического ретикулума) [9, 10].

В зависимости от механизма запуска апоптотической программы выделяют два основных сигнальных пути, ведущих к индукции апоптоза клеток млекопитающих: внешний (рецепторный) и внутренний (митохондриальный или Bcl-2-регулируемый). После ишемии головного мозга апоптотическая гибель нейронов может быть реализована как с помощью внешнего, так и посредством внутреннего пути [14, 15]. В экспериментальных исследованиях установлено, что антиапоптотический белок Bcl-2 защищает нейроны от индуцированного острой ишемией апоптоза [17]. С помощью иммуногистохимического анализа и Вестерн-блоттинга было обнаружено, что микроРНК-124 ингибирует апоптоз нейронов у крыс после ишемического инсульта при участии антиапоптотических белков Bcl-2 и STAT3 (Signal Transducers and Activators of Transcription) – преобразователь и активатор транскрипции 3, принимающий участие в сигнальном каскаде совместно с киназой JAK (Janus Kinase – Янускиназа). Показано, что Bcl-2, STAT3 и p-STAT3 демонстрируют сходные изменения в своей экспрессии синхронно с микроРНК-124 и защищают ткань головного мозга от повреждения. Исследованиями установлено, что защитный эффект микроРНК-124 осуществляется с помощью ингибитора апоптоза белка Bcl-2 и реализуется через сигнальный путь JAK2/STAT3 [17].

Понятие аутофагии. Термин «аутофагия» (от греческого αὐτό- / auto = «self» = «само-» и φαγεῖν / phagein = «поедание») был введен Кристианом де Дювом в 1963 г. для определения процесса деградации поврежденных белков и органелл в лизосомах [18, 19]. Данный процесс эволюционно связан с переходом клетки на особый тип метаболизма при неблагоприятных внешних условиях, например, нехватке питательных веществ в окружающей среде [20]. Аутофагия обеспечивает поддержание целостности клетки путем лизосомальной утилизации избыточных или поврежденных цитоплазматических белковых структур, макромолекул, белковых агрегатов [18]. Вторым способом деградации белковых макромолекул является убиквитин-протеасомный путь [19, 20].

Аутофагия является конститутивным процессом и в нормальных физиологических условиях участвует в поддержании клеточного гомеостаза (базовая аутофагия). Она играет важную роль в эмбриогенезе, старении, регуляции глюкозы в крови, а также в метаболизме аминокислот и липидов. Аутофагия может быть активирована в ответ на стрессовые воздействия: гипоксия, голодание, окислительный стресс, вирусная инфекция, механическое повреждение митохондрий, недостаток факторов роста, повреждение ДНК (индуцированная аутофагия). Подобная активация происходит с целью адаптации к стрессу и обеспечения выживания клетки в неблагоприятных условиях [21, 22].

При умеренном действии раздражителя аутофагия защищает клетку от стрессовых воздействий, однако при чрезмерных неблагоприятных воздействиях она действует синергично с апоптозом и способствует гибели клетки [23].

Установлено, что длительная и интенсивная аутофагия может привести к апоптозу, связанному с аутофагией (неканонический апоптоз) [19, 20]. Этот вид апоптотической гибели клеток происходит через конденсацию хроматина и деградацию клеточных структур, включая эндоплазматический ретикулум (ER), аппарат Гольджи и рибосомы. В отличие от классического апоптоза (программируемой клеточной гибели (ПКГ) I типа), неканонический апоптоз является каспазозависимым и требует повышенной активности лизосомальных ферментов [19].

Аутофагия является ПКГ II типа, отличной от апоптоза [20, 23]. Это связано с тем, что при аутофагии формируются аутофагосомы и аутофаголизосомы, а при апоптозе клетка гибнет за счет своих лизосомальных ферментов без образования фагосом [24].

Виды аутофагии. В зависимости от маршрута доставки клеточного груза к лизосомам выделяют три типа аутофагии: макроаутофагия, микроаутофагия и опосредованная шаперонами аутофагия.

У млекопитающих наиболее изученным видом аутофагии является макроаутофагия, при которой часть цитоплазмы образует фагофор – чашеобразную структуру с двойной мембраной для поглощения белковых агрегатов, целых или фрагментированных органелл и внутриклеточных патогенов [18]. На начальном этапе этого процесса фрагмент цитоплазмы вместе с клеточными органеллами поглощается фагофором. Захват фрагмента цитоплазмы приводит к образованию аутофагосомы, представляющей собой органеллу с двойной мембраной, которая затем сливается с лизосомой, образуя аутофаголизосому. После лизосомальной переработки захваченного материала внутренняя мембрана аутофаголизосомы разрушается вместе с включенными в нее органеллами и макромолекулами. Продукты распада (аминокислоты, нуклеотиды, простые углеводы, жирные кислоты) затем высвобождаются в цитоплазму и используются для синтеза новых функциональных белков [19].

Микроаутофагия – это процесс, при котором клеточный груз непосредственно попадает в лизосому для деградации за счет инвагинации лизосомальной мембраны [20]. Микроаутофагия направлена на разрушение мелких клеточных органелл и соединений, находящихся в цитоплазме [18]. Этот вид аутофагии протекает без образования аутофаголизосомы. Фрагмент цитоплазмы, содержащий клеточный материал, непосредственно изолируется лизосомой путем инвагинации лизосомальной мембраны [20].

Шаперон-зависимая аутофагия является высокоспецифичной формой аутофагии, которая нацелена на цитозольные белки, содержащие специфическую аминокислотную последовательность KFERQ, с помощью которой белковые субстраты распознаются шаперонами, связываются и транспортируются непосредственно к лизосоме для деградации [19]. Это целенаправленный вид транспорта клеточного груза из цитоплазмы в лизосомы, реализуемый путем связывания специфически отобранных белковых субстратов с шаперонами из семейства Hsp70 (Heat shock proteins – белки теплового шока) с образованием комплексов «шаперон-субстрат». После того, как эти комплексы распознаются рецепторами Lamp2a (lysosomal associated membrane protein 2a – ассоциированный с лизосомами мембранный белок типа 2a), они напрямую импортируются в лизосомальный просвет без поглощения мембраной. В регуляции шаперон-зависимой аутофагии участвует киназа LRRK2 (leucine-rich repeat kinase 2 – богатая лейцином повторная киназа),

наследственные мутации которой играют существенную роль в патогенезе болезни Паркинсона [18].

Выделяют селективную и неселективную аутофагию. Когда случайно выбранная часть цитоплазмы вместе с содержащимися в ней включениями подвергается лизосомальной переработке, говорят о неселективной аутофагии. Она используется для поддержания баланса между количеством и размером отдельных компонентов цитоплазмы и ответственна за общий оборот цитозольного материала. Селективная аутофагия специфически нацелена на белковые агрегаты и отдельные органеллы. При этом виде аутофагии деградации подвергаются определенные органеллы, например, митохондрии (митофагия), эндоплазматическая сеть (ретикулофагия), рибосомы (рибофагия) или пероксисомы (пексофагия) [25]. К селективной аутофагии также относят ксенофагию – процесс избирательной утилизации чужеродных агентов в лизосомах, играющий важную роль в иммунной защите против вирусных, бактериальных и паразитарных инфекций [20, 25].

Регуляция аутофагии. Аутофагия жестко регулируется на молекулярном уровне. В настоящее время известно около 30 белков, регулирующих аутофагию. Описаны 22 гена, непосредственно отвечающих за процесс аутофагии, составляющие семейство белков Atg (autophagy-related proteins) [18, 20, 24].

Выделяют три основных пути регуляции аутофагии:

- активация сигнального пути PI3K (phosphoinositide 3-kinase) класса I в ответ на ростовые факторы;
- запуск сигнального пути PI3K класса III при изменении числа аминокислот;
- активация сигнального пути LKB1/AMPK при гипоксии [19, 24].

Важнейшими регуляторами аутофагии являются две протеинкиназы: mTOR1 (mammalian target of rapamycin complex 1) и AMPK (adenosine monophosphate-activated protein kinase). Киназа mTORC1 (рапамицин чувствительный комплекс mTOR-киназы) является негативным регулятором аутофагии, в то время как AMPK представляет собой важнейший индуктор аутофагического потока [19, 26].

Киназа TOR (target of rapamycin), открытая как мишень действия антибиотика рапамицина – это консервативная серин-треониновая киназа, которая интегрирует многочисленные вне- и внутриклеточные сигналы, регулируя синтез белка, клеточный рост и метаболизм. Киназа mTOR млекопитающих существует в виде двух комплексов: рапамицин-чувствительного TORC1 и рапамицин-устойчивого mTORC2, контролирующих в клетке разные программы [24]. Главным механизмом, за счет которого киназа mTORC1 ингибирует аутофагию, реализуется за счет подавления убиквитиноподобных киназ ULK1 и 2 (ubiquitin-like kinase 1 and 2) и Atg13 (белок, взаимодействующий с Atg1/ULKs – протеинкиназой, фосфолирируемой mTORC1) [19, 26].

Киназа mTOR является интегральным компонентом сигнального пути PI3K/Akt и представляет собой центральный регулятор пролиферации за счет интеграции сигналов от ростовых факторов, питательных веществ и уровня энергии. Показано, что жизненно важные сигналы, идущие от аминокислот, инсулина, факторов роста, сходятся на киназе mTOR, которая является основным регулятором сигнального каскада, обеспечивающего поступление в клетку питательных веществ. Однако, существуют mTOR-независимые пути индукции аутофагии [27].

Комплекс mTORC1 способен активировать фосфорилированием серин-треониновую киназу Akt. Активация

сигнального пути PI3K/Akt в свою очередь активирует mTORC1 за счет ингибирования путем фосфорилирования комплекса белков туберозного склероза (TSC1-TSC2). Комплекс TSC1-TSC2, регулирующий активность mTORC1, состоит из белков хамартина и туберина и является главным супрессором mTORC1 [24, 26].

АМПК, так называемый датчик клеточной энергии («cellular energy sensor»), состоит из α , β и γ субъединиц. В эксперименте показано, что ингибирование α -субъединицы АМПК предотвращает аутофагию, вызванную гипоксией [19].

Сигнальный путь аутофагии LKB1/АМПК чувствителен к энергетическому состоянию клетки. При гипогликемии серин-треониновая киназа LKB1 (Liver kinase B1) активирует киназу АМПК при непосредственном участии mTORC1. Киназа mTORC1 регулирует энергетический статус клетки через активацию АМПК, которая активируется аллостерически за счет уровня АМФ (аденозинмонофосфат) [24].

АМПК может индуцировать аутофагию за счет ингибирования mTORC1. В ответ на низкий энергетический статус клетки АМПК усиливает катаболические и подавляет анаболические реакции, ингибируя mTORC1 прямым фосфорилированием TSC2. Таким образом, АМПК блокирует mTORC1 путем активации TSC2, способствуя аутофагии [28]. В противоположность киназе mTORC1 комплекс mTORC2 вовлечен в ингибирование фосфорилирования АМПК и индуцирует активацию mTORC1, блокируя аутофагию [24].

Альтернативным путем запуска аутофагии может служить TSC-независимый каскад, при котором АМПК фосфорилирует белок Raptor, являющийся компонентом mTORC1 [26, 28].

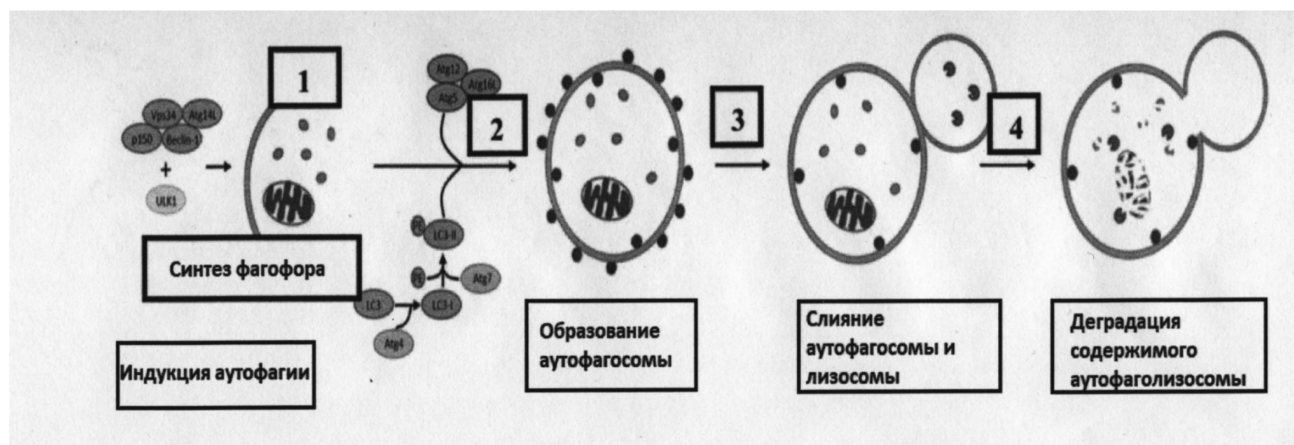
Процесс аутофагии состоит из четырех стадий: 1) фаза инициации, состоящая из синтеза изолирующей мембраны, называемой фагофором, формирующейся из фрагмента цитоплазмы; 2) фаза нуклеации/элонгации, включающая образование и удлинение изолирующей мембраны, которая впоследствии замыкается, образуя структуру аутофагосомы; 3) слияние аутофагосомы с лизосомальной мембраной, что приводит к образованию аутофаголизосомы; 4) деградация содержимого аутофаголизосомы вместе с ее внутренней мембраной и лизо-

сомальными ферментами [20]. Основные этапы процесса аутофагии представлены на рисунке.

Аутофагия как механизм гибели нейронов при остром ИИ. Связь между аутофагией и острой ишемией головного мозга продемонстрирована в экспериментальной модели инсульта [12, 29]. Использование 3-МА (3-метиладенин, ингибитор аутофагии) способствовало значительному уменьшению объема инфаркта мозга, отека и двигательного дефицита у мышей [30]. Эти нейропротективные эффекты были связаны с ингибированием индуцированной ишемией активации легкой цепи 3-И белка LC3 [6, 30], являющегося маркером активных аутофагосом [21, 22]. Другое исследование показало, что блокада аутофагии либо прямым ингибитором 3-МА, либо косвенным – 2-метоксиэстрадиолом (2МЕ2) предотвращает гибель пирамидных нейронов после ишемии [6, 7]. У мышей, дефицитных по гену Atg7, наблюдалась практически полная защита от ишемической гибели нейронов, индуцированной гипоксией, что указывает на аутофагию, как на один из важнейших механизмов деструкции клеток головного мозга после острой ишемии [7].

Установлено, что применение факторов роста способствует защите нейронов за счет ингибирования аутофагии [7]. Нейротрофический глиальный фактор (GDNF – glial cell line-derived neurotrophic factor) и фактор роста гепатоцитов (HGF – hepatocyte growth factor) предотвращали гибель нейронов при ишемическом повреждении мозга крыс. Защитный эффект осуществлялся за счет ингибирования усиленного аутофагического потока. При этом наблюдалось уменьшение содержания как аутофагических (LC3-II и Beclin-1), так и апоптотических биомаркеров (p53, Вах, каспаза-3) и отмечалось уменьшение зоны ишемии [7, 31-33]. Это свидетельствует о том, что в остром периоде ИИ аутофагия и апоптоз совместно участвуют в деструкции нейронов.

Показано, что при остром ИИ аутофагия активируется при дефиците необходимых питательных веществ после ишемической атаки [3, 34]. Во время острой церебральной ишемии переход от базального уровня аутофагии к индуцированному аутофагическому потоку в нейронах может осуществляться несколькими путями: 1) через активацию сигнального протеинкиназного каскада PI3K3→Akt→mTORC₁; 2) с помощью основного ин-



Основные стадии процесса аутофагии. 1 – синтез фагофора (изолирующей мембраны); 2 – образование аутофагосомы; 3 – слияние аутофагосомы и лизосомы с образованием аутофаголизосомы; 4 – деградация содержимого аутофаголизосомы и ее внутренней мембраны [20].

дуктора аутофагии киназы AMPK, которая активируется в результате резкого снижения уровня АТФ и повышения содержания АМФ и усиливает аутофагию за счет активации ULK1 (ubiquitin-like kinase 1 – убиквитин-подобная киназа 1 типа) или путем ингибирования mTORC1; 3) AMPK может непосредственно индуцировать митофагию посредством прямого фосфорилирования MFF (mitochondrial fission factor – фактор митохондриального деления) [9]. При использовании лекарственных ингибиторов аутофагии в экспериментальной модели ишемического инсульта установлено, что ингибирование нейрональной аутофагии происходит при связывании Bcl-2 с Beclin-1 (белок, инициирующий аутофагию), что приводит к инактивации последнего и, соответственно, отмене фазы инициации аутофагического процесса [7, 18].

В литературе имеются противоречивые данные о роли аутофагии в патогенезе острого ИИ. Существует мнение, что чрезмерная активация аутофагии при остром ИИ способствует гибели нейронов и ухудшению прогноза [3, 30, 35], в то время как умеренная аутофагия выполняет нейропротективную функцию в периоде реабилитации у пациентов с острым ИИ [31, 34, 36]. Однако большинство авторов считают, что активация аутофагического процесса является одним из трех главных механизмов гибели нейронов при остром ИИ (помимо апоптоза и некроза) и способствует прогрессированию патологического процесса [6, 7, 9, 30].

С одной стороны, имеется ряд свидетельств в пользу защитной роли аутофагии при остром ИИ. Было показано, что повышенные концентрации биомаркеров аутофагии Beclin-1 и LC3 в сыворотке и в спинномозговой жидкости пациентов с острым ИИ связаны с хорошим исходом заболевания [3]. Это свидетельствует о том, что компенсаторная умеренная активация аутофагии выполняет нейропротективную функцию при остром ИИ. Сообщалось, что рапамицин эффективно предотвращает неврологический дефицит в результате индукции защитной аутофагии нейронов головного мозга у мышей, а ингибитор аутофагии 3-МА может облегчить неврологические симптомы после ишемического инсульта [30]. Установлено, что при ишемическом церебральном прекондиционировании ER-индуцированная аутофагия способствует нейропротективному эффекту [10, 34]. Возможно, защитная роль аутофагии при остром ИИ объясняется устранением поврежденных митохондрий и блокированием апоптоза в «нижнем течении» [7].

С другой стороны, было показано, что активированная аутофагия может способствовать ухудшению исхода заболевания, участвуя в отсроченной гибели нейронов после острого ИИ [30]. Установлено, что усиленная аутофагия действует совместно с апоптозом, что приводит к усугублению нейрональной гибели при ишемическом инсульте [3, 30].

В последнее время внимание зарубежных исследователей сосредоточено на роли митохондриальной аутофагии (митофагии) в патогенезе ишемического поражения головного мозга. [6, 9, 35]. Показано, что митохондрии центрально вовлечены в повреждение нейронов и клеток микроглии при инсульте [7]. Как известно, митохондрии являются основными внутриклеточными источниками АФК (активных форм кислорода). В нормальных физиологических условиях АФК участвуют в комплексе внутриклеточных реакций, включая регуляцию фосфатаз, клеточный рост, дифференцировку, пролиферацию и апоптоз. Однако чрезмерное количество АФК может вызвать деполариза-

цию митохондрий, повышение проницаемости мембраны митохондрий, снижение митохондриального потенциала (лабораторно-диагностический признак раннего апоптоза) и способствовать запуску митохондриально-опосредованного апоптоза и митофагии [7, 9]. К факторам, индуцирующим избыточную генерацию митохондриальных АФК относятся окислительный стресс, гипоксия, глутаматная эксайтотоксичность и накопление ионов Ca²⁺, играющие центральную роль в патогенезе острого ИИ.

Порог, при котором митофагия выполняет защитную функцию при инсульте посредством контроля качества митохондрий, требует рассмотрения. Показано, что умеренное открытие МРТР (mitochondrial permeability transition pore – митохондриальной поры повышенной проницаемости) и снижение митохондриального потенциала инициирует базовую митофагию, являющуюся физиологическим процессом, который необходим для удаления поврежденных дисфункциональных митохондрий [7].

Экспериментальные исследования установили, что острый ИИ сопровождается чрезмерным открытием МРТР и вовлечением большого количества митохондрий в генерацию АФК [7, 35]. Данное явление рассматривается как компенсаторный механизм, срабатывающий в ответ на ишемическую атаку, но, вследствие нарушения баланса в генерации жизненно важных в условиях стресса молекулярных соединений, приводит к запуску митохондриально-опосредованного апоптоза и митофагии нейронов. При значительном снижении уровня клеточного АТФ происходит некротическая гибель нейронов [7, 9]. В экспериментальной модели острого ИИ показано, что акцепторы АФК напрямую активируют цитозольный LC3-I, а во внешней митохондриальной мембране регистрируется скопление аутофагического белка-адаптера p62, что свидетельствует об активном участии митофагии в патогенезе острого ИИ [7, 36]. С другой стороны, при индукции митофагии рапамицином в модели церебральной ишемии у крыс отмечалось восстановление функции митохондрий за счет рекрутирования p62 в поврежденные митохондрии [29]. Было установлено, что улучшение митохондриальной функции происходило за счет резкого уменьшения содержания малонового диальдегида, восстановления уровня АТФ и митохондриального потенциала [7, 29].

Таким образом, аутофагия при остром ИИ играет двойственную роль, в связи с чем получила в литературе название «двуликий Янус» или «обоюдоострый меч» [19, 20].

Заключение. С современных позиций, апоптоз и аутофагия представляют собой перспективные мишени для модуляции с целью разработки принципиально новых методов лечения острого ИИ. Результаты новейших исследований показывают огромное разнообразие клеточных состояний, требующих сбалансированного взаимодействия между этими двумя видами гибели клеток. Были установлены сигнальные белки, являющиеся инициаторами и эффекторами смерти клеток головного мозга как путем апоптоза, так и посредством усиления аутофагической программы. Показано, что субклеточные сайты этих белков, определяющие важнейшие сигнальные пути, были идентифицированы как ключевые медиаторы в обоих процессах. Эти протеины действуют либо синергично путем создания общих модулей, либо альтернативно путем функционирования в качестве переключателей, позволяя клеткам решать, какой путь выбрать, в зависимости от конкретной ситуации. Подобные сложные взаимодействия в первую очередь

касаются апоптотических белков антагонистов Bcl-2 и p53, а также инициатора аутофагии Beclin-1. Протеины, принимающие участие в перекрестных взаимодействиях апоптоза и аутофагии, задействованные в гибели нейронов в пенумбре при остром ИИ, представляют наибольший интерес для модуляции и таргетирования при разработке новых методов терапии инсульта. Четкое понимание межбелковых взаимодействий и воздействие на конкретные белки на определенных стадиях острого периода ИИ открывает новые перспективы для адекватной своевременной терапии, способствующей раннему прерыванию ишемического каскада, отмене отсроченной гибели нейронов и лучшему исходу заболевания.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 3-12, 14-24, 25-36 см. REFERENCES)

1. Ключник Т.П., Отман И.Н., Чуканова А.С., Надарейшвили Г.Г., Гулиева М.Ш., Гусев Е.И. Динамика маркеров апоптоза в остром периоде ишемического инсульта. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2018; 118(9):26-31.
2. Медведева Л.А., Авакян Г.Н., Загоруйко О.И., Гнездилов А.В., Скворцова В.И., Шамалов Н.А. и др. Результаты внедрения тромболитической терапии при ишемическом инсульте в Российской Федерации. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. Спецвыпуски.* 2010; 110(12): 17-22.
13. Рева И.В., Ямамото Т.Т., Одинова И.А., Мартыненко С.Г., Тоторкулов Р.И., Николаенко Г.А. и др. Апоптоз и его роль в нарушении функций нейронов. *Современные проблемы науки и образования.* 2016; 6. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25497>
24. Зубова С.Г., Шитикова Ж.В., Поспелова Т.В.. TOR-центрическая регуляция митогенных, метаболических и энергетических сигнальных путей в клетке. *Цитология.* 2012; 54(58): 589-602.

REFERENCES

1. Klushnik T.P., Otman I.N., Chukanova A.S., Nadareishvili G.G., Guliyeva M.S., Gusev E.I. The dynamics of markers of apoptosis in the acute period of ischemic stroke. *Zhurnal nevrologii i psikhiiatrii im. S.S. Korsakova. Spetsvyypuski.* 2018; 118(9): 26-31. (in Russian)
2. Medvedeva L.A., Avakian G.N., Zagorul'ko O.I., Gnezdilov A.V., Skvortsova V.I., Shamalov N.A. et al. Application of thrombolytic therapy of ischemic stroke in the Russian Federation. *Zhurnal nevrologii i psikhiiatrii im. S.S. Korsakova. Spetsvyypuski.* 2010; 11(12): 17-22. (in Russian)
3. Li H., Qiu S., Li X., Li M., Peng Y. Autophagy biomarkers in CSF correlates with infarct size, clinical severity and neurological outcome in AIS patients. *J. Transl. Med.* 2015; 13:359. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0726-3>.
4. Becker K. Autoimmune Responses to Brain Following Stroke. *Transl. Stroke Res.* 2012; 3(3): 310-7.
5. Lopes-Pinheiro M.A., Koopij G., Mizee M.R., Kamermans A., Enzmann G., Lyck R. et al. Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke. *Biochimica et Biophysica Acta.* 2016; 1862(3): 461-7.
6. Tang Y.C., Tian H.X., Yi T. and Chen H.B. The critical roles of mitophagy in cerebral ischemia. *Protein Cell.* 2016; 7(10): 699-713.
7. Guan R., Zou W., Dai X., Yu X., Liu H., Chen O. et al. Mitophagy, a potential therapeutic target for stroke. *Journal of Biomedical Science.* 2018; 25: 87. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0487-4>.
8. Gabryel B., Kost A., Kasprowska D. Neuronal autophagy in cerebral ischemia – a potential target for neuroprotective strategies? *Pharmacological Reports.* 2013; 64(1): 1-15.
9. Gong Z., Pan J., Shen Q., Li M., Peng Y. Mitochondrial dysfunction induces NLRP3 inflammasome activation during cerebral ischemia/reperfusion injury. *J. Neuroinflammation.* 2018; 15:242. <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1282-6>.
10. Gao B., Zhang X., Han R., Zhang T., Chen C., Qin Z. et al. The endoplasmic reticulum stress inhibitor salubrinal inhibits the activation of autophagy and neuroprotection induced by brain ischemic preconditioning. *Acta Pharmacologica Sinica.* 2013; 34(5): 657-66.
11. Li W., Zhang X., Zhuang H., Chen H., Chen Y., Tian W. et al. MicroRNA-137 Is a Novel Hypoxia-responsive MicroRNA That Inhibits Mi-

- tophagy via Regulation of Two Mitophagy Receptors FUNDC1 and NIX. *J. Biol. Chem.* 2016; 289(15): 10691-701.
12. Hu C., Zhao L., Wu D. and Li L. Modulating autophagy in mesenchymal stem cells effectively protects against hypoxia- or ischemia-induced injury. *Stem Cell Research and Therapy.* 2019; 10:120. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1225-x>.
13. Reva I.V., Yamamoto T.T., Odintsova I.A., Martynenko S.G., Totorkulov R.I., Nikolaenko G.A. et al. Apoptosis and its role in the dysfunction of neurons. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya.* 2016; 6. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=25497>. (in Russian)
14. Banfalvi G. Methods to detect apoptotic cell death. *Apoptosis.* 2017; 22(2): 306-23.
15. Elmore S.A., Dixon D., Hailey J.R., Harada T., Herbert R.A., Maronpot R.R. et al. Recommendations from the INHAND Apoptosis/Necrosis Working Group. *Toxicol. Pathol.* 2016; 44(2): 173-88.
16. Fan D., Krishnamurthi R., Harris P., Barber P.A., Guan J. Plasma cyclic glycine proline/IGF-1 ratio predicts clinical outcome and recovery in stroke patients. *Annals of Clinical and Translational Neurology.* 2016; 6(4): 669-77.
17. Zhang W., Meng A. MicroRNA 124 expression in the brains of rats during early cerebral ischemia and reperfusion injury is associated with cell apoptosis involving STAT3. *Exp. Ther. Med.* 2019; 17(4): 2870-6.
18. Jungverdorben J., Till A., Brüstle O. Induced pluripotent stem cell-based modeling of neurodegenerative diseases: a focus on autophagy. *J. Mol. Med.* 2017; 95(7): 705-18.
19. Chen R., Jiang M., Li B., Zhong W., Wang Z., Yuan W. et al. The role of autophagy in pulmonary hypertension: a double-edge sword. *Apoptosis.* 2018; 23(9): 459-69.
20. Taylor M.A., Das B.C., Ray S.K. Targeting autophagy for combating chemoresistance and radioresistance in glioblastoma. *Apoptosis.* 2018; 23(11-12): 563-75.
21. Chen Y., Chang C., Chen H., Hsieh C-W., Tang K-T., Yang M-C. et al. Association between autophagy and inflammation in patients with rheumatoid arthritis receiving biologic therapy. *Arthritis Res. Ther.* 2018; 20:268. <https://doi.org/10.1186/s13075-018-1763-0>.
22. Clarke A.J., Ellinghaus U., Cortini A., Stranks A., Simon A.K., Botto M. et al. Autophagy is activated in systemic lupus erythematosus and required for plasmablast development. *Ann. Rheum. Dis.* 2015; 74: 912-20.
23. Fu D., Yu J.Y., Yang S., Wu M., Hammad S.M., Connel A. R. et al. Survival or death: a dual role for autophagy in stress-induced pericyte loss in diabetic retinopathy. *Diabetologia.* 2016; 59(10): 2251-61.
24. S. G. Zubova, Zh. V. Shitikova, T. V. Pospelova. TOR-centric concept of regulation mitogenic, metabolic and energetic signal processing in cell. *Tsitologiya.* 2012; 54(58): 589-602. (in Russian)
25. Dunn W.A. Jr., Cregg J.M., Kiel A.K.W., Klei I.J., Oky M., Sakai Y. et al. Pexophagy. The Selective Autophagy of Peroxisomes. *Autophagy.* 2005; 1(2): 75-83.
26. Kucheryavenko O., Nelson G., Zglinicki T., Viktor I., Korolchuk V.I., Carroll B. The mTORC1-autophagy pathway is a target for senescent cell elimination. *Biogerontology.* 2019; 20: 331-5.
27. Li M., Lindblad J.L., Perez E., Bergmann A., Fan Y. Autophagy-independent function of Atg1 for apoptosis-induced compensatory proliferation. *BMC Biol.* 2016; 14: 70.
28. Li J., McCullough L. Effects of AMP-activated protein kinase in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2010; 30(3): 480-92.
29. Urbanek T., Kuczmik W., Basta-Kaim A., Gabryel B. Rapamycin induces of protective autophagy in vascular endothelial cells exposed to oxygen-glucose deprivation. *Brain Research.* 2014; 1553: 1-11.
30. Yang Z., Zhong L., Zhong S., Xian R., Yuan B. Hypoxia induces microglia autophagy and neural inflammation injury in focal cerebral ischemia model. *Exp. Mol. Pathol.* 2015; 98(2): 219-24.
31. Yue Z., Wang Q.J., Komatsu M. Neuronal autophagy: going the distance to the axon. *Autophagy.* 2008; 4(1): 94-6.
32. Schiller M., Bekeredjian-Ding I., Heyder P., Blank N., Ho A.D., Lorenz H.M. Autoantigens are translocated into small apoptotic bodies during early stages of apoptosis. *Cell Death Differ.* 2008; 15(1): 183-91.
33. Carmichael S.T. Targets for neural repair therapies after stroke. *Stroke.* 2010; 41(10):124-6.
34. Sheng R., Zhang L., Han R., Liu X., Gao B., Qin Z. Autophagy activation is associated with neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemic preconditioning. *Autophagy.* 2010; 6(4): 482-94.
35. Di Y., He Y., Zhao T., Huang X., Wu K.W., Liu S.H. et al. Methylene Blue Reduces Acute Cerebral Ischemic Injury via the Induction of Mitophagy. *Mol. Med.* 2015; 21: 420-9.
36. Bjorkoy G., Lamark T., Brech A., Outzen H., Perander M., Overvatn A. et al. 62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J. Cell. Biol.* 2005; 171(4): 603-14.

Поступила 02.04.20

Принята к печати 25.04.20