ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИДЕНТИФИКАЦИИ НОВЫХ МОЛЕКУЛ-МИШЕНЕЙ ДЛЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ ГЕМАТОЭНЦЕФАЛИЧЕСКОГО БАРЬЕРА

А. В. Моргун, В. А. Рузаева, Е. Б. Бойцова, Т. Е. Таранушенко, Г. П. Мартынова, А. Тохидпур, А. Б. Салмина[1]

Обзор литературы посвящен современной тактике идентификации молекул-мишеней для разработки препаратов, восстанавливающих структурно-функциональную целостность гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) при повреждении головного мозга и нейровоспалении. В статье обсуждаются некоторые новые – в контексте регуляции проницаемости ГЭБ – молекулы-мишени, регулирующие ключевые пути сигнальной трансдукции с участием HIF-1, JNK, NF-kB, Rac1 и других молекул, экспрессию белков клеточных контактов и ферментов, а также ферментов, генерирующих молекулы с провоспалительной активностью, в клетках ГЭБ.

Ключевые слова: головной мозг; нейровоспаление; ишемия; гематоэнцефалический барьер; проницаемость; молекулы-мишени; фармакотерапия.

Нарушения структурной и функциональной целостности гематоэнцефалического барьера при повреждении головного мозга

Повреждение головного мозга, индуцированное действием широкого спектра факторов, практически всегда сопровождается развитием воспаления. Именно воспаление является типичной реакцией на действие инфекционных агентов, а также характерно для гипоксически-ишемических и травматических повреждений, стресса, нейродегенеративных заболеваний, токсических воздействий, феномена эксайтотоксичности, нарушений развития головного мозга [19, 56, 70]. Это обусловлено тем, что независимо от первичного воздействия происходит активация основных эффекторных клеток – микроглии и астроцитов (реактивный глиоз), индукция экспрессии генов, определяющих ответ клетки на действие повреждающего фактора, продукция молекул с про- или противовоспалительной активностью, реализуются механизмы иммунного ответа. Таким образом, нейроваскулярная единица (НВЕ) головного мозга, объединяющая функционально сопряженные друг с другом клетки эндотелия, перициты, нейроны, астроциты и микроглию, внеклетоный матрикс, а также находящиеся в сосудистом русле и мигрирующие в очаг повреждения клетки крови, становится “плацдармом” для реализации механизмов нейровоспаления, призванных ограничить участок повреждения мозга и обеспечить процессы репаративного нейрогенеза и ангиогенеза. Изменения проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) отражают процессы, происходящие в пределах НВЕ [24]. Известно, что ГЭБ – это полупроницаемый барьер между кровью и нервной тканью, препятствующий проникновению в мозг крупных молекул, клеток крови, в том числе иммунной системы, микроорганизмов, токсических веществ и метаболитов, и располагающий для выполнения этой функции специализированными транспортными системами, обеспечивающими трансфер соединений в обоих направлениях [16, 83].

Изучение механизмов функционирования ГЭБ, нарушения его структурной и функциональной целостности при патологии центральной нервной системы (ЦНС) – одна из ключевых задач, решение которой имеет существенное значение для современной нейрофармакологии, нейротоксикологии, неврологии и психиатрии. В практической медицине по-прежнему остаются актуальными вопросы, связанные с патологической проницаемостью ГЭБ при нейроинфекциях, ишемии головного мозга, заболеваниях, ассоциированных с нарушением развития головного мозга, а также с проблемами проникновения через ГЭБ фармакологических препаратов [2, 10]. Новые фундаментальные знания о функционировании ГЭБ изменят клинические протоколы ведения пациентов с патологией ЦНС, а также протоколы доклинического исследования нейротропных лекарственных средств [1].

Воспаление характеризуется драматически возрастающей продукцией провоспалительных цитокинов, индукцией экспрессии молекул клеточной адгезии (интегрины, селектины, кадгерины), активацией широкого спектра ферментов (протеазы, NO-синтаза, НАД(Ф)Н-оксидаза, миелопероксидаза, циклооксигеназы (ЦОГ) 1 и 2 типов, металлопротеиназы (ММР) и

[1] Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого, Министерство здравоохранения Российской Федерации, Россия, 660022, Красноярск, ул. П. Железняка, 1.

т.д.), генерирующих низкомолекулярные медиаторы воспаления (оксид азота, активные формы кислорода и азота, эйкозаноиды и др.) и участвующих в разрушении клеток (аутофагия, апоптоз).

Общепризнано, что основными клетками, участвующими в реализации воспаления, являются клетки активированной микроглии [35] и астроглии [66]. Активация микроглии сопровождается направленной миграцией этих клеток в очаг нейровоспаления, гиперпродукцией свободных радикалов и цитокинов, проявлением собственного цитотоксического потенциала клеток микроглии. Активация астроцитов обеспечивает нейрон-астроглиальное метаболическое сопряжение, реализуемое за счет гликолитической продукции лактата в астроцитах и его утилизации в нейронах. Активность астроцитов важна для регуляции кровотока в активных регионах мозга за счет механизмов глиоваскулярного контроля, а также для локальной продукции цитокинов, индукции репаративных процессов и формирования астроглиального "рубца". Таким образом, клетки микроглиальной и астроглиальной природы представляют собой наиболее очевидную мишень для действия фармакологических препаратов, корректирующих воспаление. Вместе с тем менее изученным является вопрос возможности регуляции патологической проницаемости ГЭБ за счет адресного воздействия препаратов на клетки астроглиальной природы в пределах НВЕ.

Астроциты, участвующие в процессе воспаления, экспрессируют большое количество транспортеров глутамата, глутамина, глюкозы, секретируют провоспалительные цитокины (интерлейкины (ИЛ) 1 и 6, фактор некроза опухоли α (ФНО-α), трансформирующий фактрор роста β) и сами становятся объектом регуляторного действия молекул с провоспалительной активностью. В результате этого в астроглии активируются внутриклеточные процессы, связанные с увеличением уровня кальция в цитозоле, а также ферменты, участвующие в продукции свободных радикалов и в защите клеток от них [17, 33]. Благодаря тесному функциональному сопряжению астроцитов и эндотелиоцитов эти события приводят к изменению просвета и проницаемости капилляров головного мозга, нарушению плотных и щелевых контактов, нарушению функционирования транспортных систем в клетках церебрального эндотелия, что сопровождается увеличением внеклеточной протеолитической активности, повреждением структуры экстрацеллюлярного матрикса и клеток эндотелия и астроглии [42, 79].

Повышение проницаемости ГЭБ способствует миграции в головной мозг активированных лейкоцитов, метаболитов и токсинов, а также аккумуляции в ткани мозга клеток резидентной микроглии. В результате этого в очагах патологической проницаемости ГЭБ создаются условия для альтерации клеток, индукции формирования инфламмасом в клетках астроглиальной и микроглиальной природы, инфламмасома-опосредованной продукции провоспалительных цитокинов. Вместе с тем именно в участках воспаления инициируются процессы репаративного нейрогенеза и ангиогенеза. В целом, структурная целостность ГЭБ нарушается из-за снижения экспрессии или нарушения сборки белков тесных контактов, повреждения базальной мембраны ГЭБ, гибели эндотелиоцитов, чему дополнительно способствуют изменения взаимодействий между клетками эндотелия и прилежащими астроцитами [23, 60, 78]. Как следствие, в периферической крови определяются "забарьерные" белки, белки-маркеры повреждения ГЭБ (фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), нейротрофический фактор мозга, глиальный фибриллярный кислый белок, нейронспецифическая енолаза, молекула главного комплекса гистосовместимости II класса, молекула клеточной адгезии активированных лейкоцитов, семейство протеинов S100, клаудины, окклюдины, кадгерины, секретируемые астроцитами белки Shh, Wnts, Norrin), а также метаболиты (например, глутамат) и цитокины, свидетельствующие о феномене "прорыва" ГЭБ) [3, 12, 40, 69]. В свою очередь, нарушается селективная проницаемость ГЭБ для многих "периферических" метаболитов, которые в условиях нейровоспаления начинают проникать в ткань головного мозга, дополнительно нарушая функциональную активность клеток и способствуя поддержанию воспалительного процесса.

Изучение молекулярных механизмов взаимодействия клеток НВЕ в (пато)физиологических условиях создает основу для идентификации новых молекул-мишеней для фармакотерапии нейровоспаления. Прогресс в этих исследованиях определяется развитием аналитических методов и разработкой моделей ГЭБ *in vitro*.

Методология поиска новых молекул-мишеней для фармакологической коррекции проницаемости ГЭБ

Основу методологии поиска новых молекул-мишеней для фармакотерапии составляют молекулярные данные, полученные при изучении структуры макромолекул и малых молекул клеток и тканей, механизмов сигнальной трансдукции и межклеточной коммуникации, при оценке закономерностей и регуляции экспрессии генов и белков, а также идентификации молекул-маркеров патологических процессов. Применительно к задачам коррекции патологической проницаемости ГЭБ эти данные могут быть получены с помощью современных методов клеточной биологии, нейробиологии, нейрофизиологии, физико-химической медицины, молекулярной генетики, биохимии, медицинской физики и биофизики.

В настоящее время существует достаточно много современных экспериментальных и клинических лабораторных методов, которые позволяют изучить механизмы повреждения ГЭБ и зарегистрировать изменение экспрессии в клетках НВЕ белков, актуальных для развития воспаления, либо идентифицировать в спинномозговой жидкости и периферической крови молекулы, маркирующие собой патологическую проницаемость ГЭБ. Наибольшей информативностью в данном контексте обладают методы молекулярного профилирования (иммуногистохимический метод, иммуноблоттинг, иммуноферментный анализ, протеомный анализ), электрофизиологические методы (putch clamp), визуализация *in vivo*. Объектами для проведения этих исследований могут являться кровь, ликвор, ткани, культуры клеток.

Методы молекулярного профилирования. Иммуногистохимический метод – метод выявления точной локализации специфического клеточного или тканевого компонента (антигена) благодаря связыванию его с антителами, меченными флуорофорами, биотином или ферментами. Иммуногистохимическое исследование ткани головного мозга – один из наиболее распространенных подходов к оценке экспрессии белков, участвующих в механизмах сигнальной трансдукции и межклеточной коммуникации [6], и часто дополняется оценкой экспрессии генов, кодирующих эти белки, или протоколами иммуноблоттинга. Иммуноблоттинг – высокочувствительный метод идентификации белков и количественной оценки их экспрессии [49]. При заболеваниях, сопровождающихся воспалением, его применение позволяет обнаружить в крови и ликворе молекулы, которые часто не определяются другими рутинными методами исследования, например, стандартными протоколами иммуноферментного анализа [4]. Основная задача протеомных исследований – это количественный и качественный анализ экспрессии белков с применением высокочувствительных методов (например, масс-спектрометрии) для характеристики протеомного профиля клеток или ткани [8, 9]. Описание и сравнение протеомов ГЭБ в (пато)физиологических условиях – одна из наиболее важных и актуальных задач современной нейрохимии, решение которой сможет определить перспективы развития нейрофармакологии на десятилетия вперед. В целом, с учетом того, что регуляция проницаемости ГЭБ является результатом интегральной активности нескольких типов клеток, протоколы молекулярного профилирования должны включать в себя обязательное фенотипирование клеток-компонентов НВЕ для определения популяции клеток, преимущественно экспрессирующей потенциальную молекулярную мишень.

Методы визуализации in vivo дают возможность неинвазивно или малоинвазивно в условиях, приближенных к физиологическим, получить изображение и наблюдать динамику молекулярных событий на уровне целого организма, на клеточном и субклеточном уровнях. Этот подход активно развивается и успешно применяется в фармакологических и медико-биологических исследованиях моделей заболеваний человека на экспериментальных животных. Выделяют методы, использующие ионизирующее излучение, в частности, позитронно-эмиссионную томографию, однофотонную эмиссионную компьютерную томографию, компьютерную томографию, а также методы, не подразумевающие использования ионизирующего излучения: магнитная резонансная томография, ультразвуковые и оптические методы [7]. Однако, к сожалению, большинство из этих методов не регистрирует напрямую процессы, происходящие в пределах ГЭБ, но позволяют косвенно судить о наличии или отсутствии его повреждения.

Электрофизиологические исследования клеток и тканей – метод локальной фиксации потенциала (patch clamp) – это “золотой стандарт” в изучении молекулярных процессов, проходящих на мембранах клеток различной природы в составе НВЕ головного мозга как в физиологическом состоянии, так и при патологии. Метод применяется в нескольких конфигурациях и позволяет оценить молекулярные события, происходящие с участием ионных каналов клеток и сопряженных сигнальных молекул. Объектом исследования при этом становятся не только нейроны, традиционно используемые в электрофизиологических экспериментах, но и сопряженные с ними функционально другие клетки НВЕ (клетки эндотелия, астроглии), экспрессирующие ионные каналы, изменение активности которых сопровождает процессы сигнальной трансдукции и межклеточной коммуникации. Сочетание метода с протоколами компьютерной симуляции, оптическими методами и подходами оптогенетики позволяет получать комплексную информацию о механизмах участия тех или иных механизмов в регуляции функциональной активности клеток головного мозга.

Современные методы оценки проницаемости ГЭБ *in vitro* (например, измерение трансэндотелиального электрического сопротивления) или *in vivo* (например, с применением красителей или флуоресцентных зондов, избирательно проникающих через неповрежденный ГЭБ) позволяют оценить эффективность модуляции экспрессии или активности молекул-мишеней для направленной регуляции проницаемости ГЭБ. В целом, достаточно часто перечисленные выше методы используются в сочетании [34, 57], дополняя друг друга и нивелируя недостатки, связанные с ограничениями в чувствительности, возможностью работы с фиксированными или нефиксированными объектами, трудностями в пробоподготовке.

Модели воспаления *in vivo* и модели ГЭБ, воспроизводящие клеточно-молекулярные механизмы воспалительных реакций

Применение моделей заболеваний человека на животных является обязательной составляющей современной экспериментальной нейробиологии и нейрофармакологии [64]. Однако, применительно к задачам изучения ГЭБ, исследователи имеют дополнительную возможность воспроизводить и изучать ключевые процессы с использованием моделей ГЭБ *in vitro*.

Экспериментальные модели воспаления на животных. Изучение особенностей развития апоптоза клеток ЦНС в отдельных областях головного мозга при бактериальных заболеваниях ЦНС, а также влияния провоспалительных цитокинов на проницаемость ГЭБ проведено авторами [60], которые использовали лизаты стрептококков группы В и пневмококков для введения в цистерны головного мозга крыс 7- и 11-дневного возраста. В ходе исследования доказана роль порообразующих цитотоксинов стрептококка группы В и пневмококка (β-гемолизин/цитолизин и пневмолизин) в развитии нейродегенеративных процессов в головном мозге при бактериальных менингитах. В первую очередь установлено, что цитотоксины вызывают повреждение нейронов головного мозга, увеличивают проницаемость сосудистой стенки, блокируют действие ингибиторов апоптоза (ингибитор каспаз z-VAD-fmk), препятствуя при этом миграции лейкоцитов в ЦНС [60]. Интересная модель пневмококкового менингита была воспроизведена у экспериментальных животных с использованием культуры *Str. pneumoniae* I серовара. Авторы предлагают эту модель для изучения роли свободно-радикального окисления и системы антиоксидантной защиты в ткани головного мозга в периоде разгара бактериального гнойного менингита в первые 48 – 72 ч заболевания [11]. Установлены особенности развития альтеративного церебрального васкулита и повреждения эндотелиоцитов при бактериальном менингите, а также обоснована необходимость использования препаратов, обладающих ангиопротекторным и ангиотропным действием, в том числе препаратов, влияющих на пластические и обменные процессы в стенках микрососудов и периваскулярной ткани. Определена диагностическая роль десквамированных церебральных эндотелиоцитов как маркеров повреждения ГЭБ. Исследования по выявлению биомаркеров повреждения ГЭБ при воспалении вследствие травматических и токсических воздействий проведено в работе [36]. Установлено, что одним из регуляторов воспаления являются α7-никотиновые рецепторы, подтверждена диагностическая роль десквамированного церебрального эндотелия при воспалении, зафиксировано достоверное увеличение в крови уровней CD133 (проминин-1), CD146, белка S100B и убиквитин тиолэстеразы. Результаты исследования обозначили потенциальные биомаркеры повреждения ГЭБ при диагностике травматического и токсического поражения ЦНС, а также молекулы-мишени для разработки новых фармакотерапевтических подходов.

Экспериментальные модели ГЭБ для изучения воспаления in vitro. Еще одним из способов изучения патогенеза заболеваний ЦНС и патологии ГЭБ является использование клеточных моделей ГЭБ *in vitro* [84]. Первое поколение жизнеспособных клеточных моделей *in vitro* появилось около 30 лет назад [61]. Моделирование патологии на клеточных ансамблях позволяет ближе подойти к решению вопроса о патоморфологии воспалительных заболеваний ЦНС, молекулярно-клеточных механизмах межклеточных взаимодействий в (пато)физиологических условиях, более точно определить молекулы-маркеры при нейровоспалении и молекулы-мишени для достижения нейропротекторного эффекта. Однако существуют определенные и достаточно специфические требования к модели ГЭБ *in vitro*, которая может быть использована для тестирования препаратов с потенциальной противовоспалительной активностью. В частности, такая модель ГЭБ должна обеспечивать возможность воспроизведения событий, связанных с направленной миграцией клеток крови в поврежденную ткань и реализацией иммунного ответа, что требует сохранения полноценной и контролируемой экспрессии молекул клеточной адгезии, рецепторов цитокинов и хемокинов, а также экспрессии транспортных белков на эндотелиоцитах церебральных микрососудов, применяемых при сборке двух- или трехкомпонентной клеточной модели (например, эндотелиоциты + перициты + астроглия). Более того, именно в моделях ГЭБ, пригодных для изучения воспаления, должны воспроизводиться взаимодействия всех клеток НВЕ, включая микроглию. Однако именно ее принадлежность к НВЕ некоторые авторы по-прежнему оспаривают, вследствие чего микроглиальные клетки до сих пор обычно не входят в состав мультиклеточного ансамбля, формирующего модель ГЭБ *in vitro*. Включение дополнительных клеточных элементов в модель (в частности, клеток микроглии) придает модели нужные свойства, однако делает управление процессами в такой модели более сложным. Следует отметить, что значительный прогресс в разработке моделей ГЭБ *in vitro* для тестирования препаратов-модуляторов проницаемости ГЭБ может быть связан с применением технологий микрогидродинамики. Микрогидродинамика формирует новое направление в методологии идентификации молекул-мишеней для фармакотерапии заболеваний ЦНС [5]. Это междисциплинарная область, описывающая поведение ультрамалых объёмов и потоков жидкостей, что особенно актуально при воспроизведении *in vitro* событий, происходящих на поверхности клеток эндотелия, соприкасающихся с потоком жидкости и обменивающихся с ним большим количеством метаболитов и макромолекул. Одним из важных приложений микрофлюидики является технология “лаборатория-на-чипе”, подразумевающая использование микробиореакторов, в которых функционируют миниатюрные клеточные модели различных органов и тканей человеческого тела. Развитие методологии микрофлюидики обеспечивает получение новой информации о механизмах взаимодействия клеток и влиянии эндогенных и экзогенных веществ на их функциональную активность [51], кроме того, микробиореакторы и микроанализаторы перспективны для применения в клинической лабораторной диагностике, токсикологии, в контроле качества препаратов [37, 80]. Применительно к моделям ГЭБ *in vitro* микрогидродинамичесие технологии позволяют реконструировать события, связанные с движением жидкости вдоль эндотелиального слоя клеток и развитием так называемого стресса напряжения (shear stress), в условиях которого взаимодействие клеток эндотелия с лейкоцитами значительно меняется по сравнению со статичными условиями.

Вместе с тем даже применение “классических” моделей ГЭБ *in vitro* позволяет оценивать некоторые важные механизмы воспаления. Так, на стандартной клеточной модели ГЭБ было успешно изучено влияние ингибиторов ЦОГ (индометацин, лорноксикам и целекоксиб) на церебральные эндотелиоциты и проницаемость ГЭБ. В исследовании использовались 2 клеточные модели на основе клеток эндотелия церебральных микрососудов свиней и эндотелиальных клеток пуповины человека [30]. На таких моделях установлено, что при развитии нейровоспаления неселективные ингибиторы ЦОГ-1 (индометацин, лорноксикам) обладают более выраженным протекторным действием, по сравнению с селективным ингибитором ЦОГ-2 (целекоксиб). Убедительно показано, что терапевтический и протекторный эффект противовоспалительных препаратов реализуется через увеличение экспрессии белков плотных контактов (окклюдин) и белков адгезии (ICAM-1, VCAM-1). В работе [20] продемонстрировано, что при нейровоспалении наблюдается нарушение экспрессии эндотелиоцитами белков плотных контактов, молекул клеточной адгезии (окклюдины, клаудины, PECAM-1, ICAM-1, ICAM-2 и VCAM-1) и их появление в ликворе и периферической крови. В этой работе авторы использовали клеточную модель ГЭБ *in vitro*, в которой моделировали воспаление с помощью бактериальных липополисахаридов, тем самым меняя экспрессию молекул клеточной адгезии и локальную продукцию цитокинов и хемокинов.

Таким образом, применение современных протоколов идентификации молекул-мишеней и моделей, воспроизводящих нарушения структурной и функциональной целостности ГЭБ, характерные для повреждения головного мозга и воспаления, позволило идентифицировать молекулы, перспективные для избирательной фармакотерапии. Условно можно выделить несколько групп новых молекул-мишеней ГЭБ для нейрофармакологических препаратов: 1) молекулы межклеточных контактов; 2) молекулы сигнальных путей, ассоциированные с гипоксия-индуцированным транскрипционным фактором (HIF-1); 3) молекулы-ферменты, способствующие развитию воспаления в ткани.

Молекулы межклеточных контактов

Перспективными молекулами-мишенями для лекарственных средств при воспалении и гипоксически-ишемических поражениях головного мозга являются белки, участвующие в формировании контактов между эндотелиоцитами, в частности, ZO-1, окклюдины и F-актин (белки плотных контактов и цитоскелета) и молекулы адгезии ICAM-1, VCAM-1. Так, в экспериментальных исследованиях с применением протоколов прекондиционирования было установлено, что указанные белки в результате гипоксического прекондиционирования приобретают устойчивость к последующим гипоксически-ишемическим воздействиям вследствие стабилизации белков плотных контактов и молекул клеточной адгезии. Результатом прекондиционирования является предотвращение повреждения ГЭБ и уменьшение выраженности нарушений его проницаемости [15].

Белки тесных контактов являются субстратом для широкого круга протеинкиназ. Известно, что не связанные с клеточным рецептором тирозинкиназы (Src-киназы) – это регуляторы функциональной активности белков тесных контактов, в частности, они контролируют сборку окклюдинов в составе мембран контактирующих клеток, например, после перенесенного окислительного стресса. Ингибиторы Src-киназ оказывают протекторное действие на клетки головного мозга и уменьшают проницаемость ГЭБ при нейровоспалении, которое развивается в результате ишемии с последующей реперфузией, что часто наблюдается при восстановлении кровотока после тромболитической терапии. Авторы [50] изучили влияние левотетрагидропальматина, полученного из травянистых растений рода *Corydalis* (хохлатка), и установили, что изученное вещество ингибирует активность Src-киназ, предотвращая повреждение ГЭБ у экспериментальных животных.

Молекулы HIF-1-ассоциированных сигнальных путей

Перспективным, с точки зрения терапевтического воздействия на воспаление, является воздействие на молекулы сигнальных путей, ассоциированных с HIF-1. HIF-1 взаимодействует с другими транскрипционными факторами и коактиваторами, образуя транскрипционный комплекс, активирующий транскрипцию некоторого количества генов, отвечающих за выживание организма в состоянии гипоксии. Так, HIF-1 регулирует транскрипцию эритропоэтина, способствует экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), транспортеров глюкозы, ферментов гликолиза, что обеспечивает неоваскуляризацию и нейропротекцию. Одновременно с этим у HIF-1 наблюдаются нейротоксические эффекты, которые связаны с его участием в процессах апоптоза и некроза клеток посредством активации кальпаинов. Гиперэкспрессия HIF-1 также может усугубить отек мозга и повышение проницаемости ГЭБ [27], что отчасти объясняется увеличением продукции VEGF. В целом, известно, что гипоксия инициирует экспрессию генов, способствующих приобретению клетками провоспалительного фенотипа, поэтому не удивительно, что увеличение уровня HIF-1 имеет своим результатом активацию клеток микроглии и астроглии, стимуляцию продукции цитокинов, хемокинов и эйкозаноидов, увеличение проницаемости ГЭБ. Таким образом, молекулы, участвующие в реализации сложных функций HIF-1, являются потенциальными мишенями для редуцирования патологической проницаемости ГЭБ, как это было ранее показано в исследовании фармакологической активности ингибитора внутриклеточной аккумуляции HIF-1-3-(5′-гидроксиметил-2′-фурил)-1-бензилиндазола (YC-1) [82].

HIF-1 стимулирует PI3-K/Akt (фосфатидилинозитол-3-киназа/Akt)-опосредованный путь сигнальной трансдукции, что в ряде случаев сопряжено с активностью транскрипционного фактора NF-kB как ключевого регулятора воспаления. Ранее было установлено, что прекондиционирование, достигаемое малыми дозами липополисахарида, приводит к увеличению активности Akt-киназы и продукции оксида азота в ткани головного мозга, что оказывает протекторное действие при последующей гипоксии [46]. Ишемическое прекондиционирование снижает экспрессию NF-kB и редуцирует проявления воспаления, это соответствует увеличению активности Akt-киназы, снижению экспрессии ЦОГ-2 и CD68, подавлению активности микроглии [65, 83]. Противовоспалительное действие гранулоцитарного колониестимулирующего фактора G-CSF в ткани головного мозга ассоциировано с активацией PI3- K/Akt-сигнального пути, что связывают с подавлением экспрессии NF-kB, снижением активности киназы гликогенсинтазы, уменьшением продукции провоспалительных цитокинов и стабилизацией межклеточных контактов в эндотелии церебральных сосудов [45].

Белком, функционально сопряженным с HIF-1/PI3-K/Akt и участвующим в различных клеточных процессах – метаболизм гликогена, передача сигналов инсулина, пролиферация клеток, барьерогенез, регуляция функции нейронов, онкогенез, – является киназа гликогенсинтазы. С учетом значительного разнообразия процессов, которые регулируются GSK3β, не удивительно, что этот фермент активно изучается при различных заболеваниях, сопровождающихся воспалением в ЦНС, а ингибиторы GSK3β исследуются в качестве лекарственных средств. В головном мозге GSK3β экспрессируется нейронами, астроцитами и эндотелиоцитами, особенно высокая экспрессия обнаружена в клетках гиппокампа [18]. Ряд исследований продемонстрировал ключевую роль GSK3β-ассоциированных клеточных и молекулярных сигнальных каскадов в развитии воспаления [31]. GSK3β оказывает влияние на стабильность белков плотных контактов, уровень цАМФ, стимулирует секрецию цитокинов (ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-6), экспрессию NO-синтазы, ЦОГ-2, а также способствует миграции лейкоцитов из кровеносного русла в ткань головного мозга. Одновременно с этим доказано, что ингибирующее воздействие препаратов на GSK3β оказывает положительный эффект при воспалении. Зафиксировано, что ингибиторы GSK3β индуцируют экспрессию белков плотных контактов и стабилизируют их, уменьшают лейкоцитарную миграцию и адгезию, уменьшают секрецию провоспалительных цитокинов [59, 63]. Уменьшение выраженности воспаления при активации PI3-K/Akt-сигнального пути связывают с тем, что при этом блокируется функциональная активность GSK3β, одновременно с этим зафиксировано уменьшение фосфорилирования tau-белков, что очень важно в контексте патогенеза болезни Альцгеймера [45].

Изучен эффект влияния на воспаление миноциклина (антибиотик тетрациклинового ряда). При применении миноциклина, как отмечают авторы, происходит значительное уменьшение экспрессии и активности HIF-1 и MMP-2, MMP-9 с одновременным увеличением экспрессии белков плотных контактов (ZO-1, клаудин-5, окклюдины) в эндотелиальных клетках [81], что наряду с данными о коррекции механизмов синаптической пластичности и подавлении активности липоксигеназы при действии миноциклина свидетельствует о большом потенциале этого препарата в терапии заболеваний ЦНС, сопровождающихся воспалением.

Еще одна молекула-мишень для коррекции патологической проницаемости ГЭБ – JNK-киназа – член семейства MAPK (митоген-активированных протеинкиназ), регулирующая широкий спектр биологических процессов, в том числе и в клетках головного мозга, в частности, опосредующая повышение проницаемости ГЭБ при действии ряда эндогенных гуморальных регуляторов, сопряженное с нарушением экспрессии белков тесных контактов (ZO-1, окклюдин) в клетках эндотелия мозговых сосудов. Подавление экспрессии JNK (например, иматинибом) предотвращает увеличение проницаемости ГЭБ в эксперименте [85]. Однако эффекты избирательного действия на активность JNK обладают “двойственностью”: при системном ингибировании активности проявляются токсические эффекты вследствие блокады физиологической функции этого фермента. В целом, блокада активности JNK представляет собой достаточно эффективную терапию патологических состояний (нейродегенеративные, онкологические заболевания, гипоксически-ишемические поражения ЦНС) [26]. Известно, что киназы митоген-активированной протеинкиназы 4 и 7 (MKK4 и MKK7), фосфорилирующие JNK, являются обязательными участниками пути активации JNK в клетках. Так, в работе [75] показано, что избирательное блокирование JNK путем подавления активирующей активности MKK7 значительно уменьшает гибель нейронов при развитии эффекта эксайтотоксичности, а также при развитии гипоксически-ишемического поражения головного мозга. При использовании синтезированного авторами [75] пептида-ингибитора MKK7 зафиксировано уменьшение размеров зоны инфаркта головного мозга, причем эффект оказался длительным. Сходные эффекты обнаружены и при управлении активностью MKK4 [41].

Установлено, что активация MKK4 и MKK7 происходит под влиянием тиоредоксина – белка, участвующего в окислительно-восстановительных реакциях. Таким образом, тиоредоксин активирует последовательно MKK4, а также JNK и NF-kB [41]. Интересно, что тиоредоксин оказывает активирующее влияние и на HIF-1-сигналинг, экспрессию сосудисто-эндотелиального фактора роста и, тем самым, может участвовать в ангиогенезе и регуляции проницаемости ГЭБ. Хорошо изучены эффекты ингибирования тиоредоксина при терапии онкологических заболеваний, когда проявляется максимальный цитотоксический эффект в гипоксических областях опухолевой ткани [38, 53, 67]. Принимая во внимание эти данные, можно обозначить тиоредоксин, а также сигнальные пути, в которых он участвует (JNK- и HIF-1-опосредованные), как мишени для фармакотерапии воспаления и восстановления физиологической проницаемости ГЭБ, что было экспериментально подтверждено на примере 1-метилпропил-2-имидазолил дисульфида (PX-12) – ингибитора тиоредоксина.

Интересно, что у МКК4 обнаружено активирующее влияние на активность NF-kB, что дополнительно провоцирует явления нейровоспаления. Учитывая провоспалительный эффект NF-kB, этот сигнальный путь можно рассматривать как мишень для регуляции проницаемости ГЭБ [44]. Доказано, что активация NF-kB происходит не только под влиянием HIF-1 в условиях гипоксии, но и при действии липополисахаридов. В частности, липополисахариды вызывают активацию Toll-подобных рецепторов (TLR) астроцитов, что имеет результатом формирование инфламмасом, запуск NF-kB, MAPK и JAK1/Stat1 сигнальных путей, повышение секреции провоспалительных цитокинов (ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-15, ИЛ-27), активацию матриксных металлопротеиназ. Все это сопровождается значительным повышением проницаемости ГЭБ, что объясняется повреждением белков плотных контактов, кадгеринов и разрушением эндотелиоцитов [32].

NF-kB активируется ферментом-модулятором NEMO (NF-kB essential modulator), при блокировании NEMO наблюдается гибель эндотелиальных клеток, церебральная гипоперфузия, разрушение сосудистой стенки и нарушение проницаемости ГЭБ. Таким образом, NEMO реализует нейропротекторный эффект и сохраняет целостность ГЭБ путем активации транскрипционного фактора NF-kB и стабилизации эндотелиальных окклюдинов. Возможно, что NEMO оказывает нейропротекторный эффект NF-kB-независимым образом за счет подавления окислительных процессов. Понимание молекулярного патогенеза воспаления в ЦНС, ассоциированного с активностью NF-kB-зависимых механизмов, позволяет по-новому подойти к разработке препаратов, имеющих своей мишенью сигнальный путь, инициируемый NF-kB [62].

В последнее время появилось значительное количество исследований, посвященных роли Rac1-сигналинга в развитии воспаления и нейродегенеративных заболеваний. Rac1 является представителем семейства Rho-белков (малых гуанозинтрифосфатаз). Под контролем активности Rac1 находятся следующие события, актуальные для функционирования клеток: 1) экспрессия HIF-1, определяющая характер ответа клеток на гипоксию, эффекты инсулина и метаболизм глюкозы; 2) экспрессия и внутриклеточный транспорт транспортера глюкозы GLUT4; 3) изменения белков цитоскелета, в частности, необходимые для стеллации астроцитов; 4) продукция свободных радикалов, секреция матриксных металлопротеиназ, важных для ремоделирования внеклеточного матрикса, что, в целом, сообщает этому белку потенциально важную роль в регуляции функционирования клеток НВЕ. Модуляция Rac1-зависимых сигнальных путей тестируется как метод терапии при нейродегенеративных заболеваниях [48, 71, 72]. Rac1 также является важным регулятором НАДФН-оксидазы в мембранах клеток, NF-kB-контролируемой транскрипции провоспалительных генов, что может определять его значение в регуляции активности микроглии и мигрирующих в ткань головного мозга при воспалении лейкоцитов, проходящих через ГЭБ [25]. Установлено, что фармакологическое ингибирование активности Rac1 и НАДФН-оксидазы оказывает нейропротекторный эффект в клеточных культурах [55, 73]. Кроме того, в условиях гипоксии активация Rac1 происходит под контролем HIF-1. При этом отмечается очень быстрая дестабилизация белков плотных контактов, повреждение эндотелиоцитов и активизация миграции лейкоцитов в ткань головного мозга. В работе [77] доказано, что использование ингибиторов Rac1 при сохранении активности HIF-1 приводит к стабилизации межклеточных контактов эндотелиоцитов и уменьшению миграции клеток в ткань головного мозга. В свою очередь, имеются доказательства того, что Rac1 является одним из индуцирующих и активирующих факторов для HIF-1. Эффект реализуется активными формами кислорода, которые образуются в результате работы Rac1 и активируют HIF-1. При этом образующийся оксид азота может в некоторой степени ингибировать процесс активации HIF-1, вызванный активными формами кислорода [58]. Таким образом, воздействия, направленные на подавление активности Rac1, опосредованно влияют и на HIF-1-сигнальный путь, что может быть использовано с целью разработки новых эффективных препаратов, регулирующих проницаемость ГЭБ при воспалении.

Молекулы с ферментативной провоспалительной активностью

Еще одной группой молекул, которые могут выступать в роли мишеней для терапевтического воздействия при заболеваниях ЦНС, сопровождающихся воспалением, являются ферменты, генерирующие молекулы с провоспалительной активностью.

Синтез ряда эйкозаноидов катализируется ЦОГ, которая присутствует в 3 изоформах – ЦОГ-1, ЦОГ-2 и ЦОГ-3, однако при воспалении, например, ассоциированном с развитием болезни Альцгеймера, ЦОГ-3, вероятнее всего, играет вспомогательную роль. В головном мозге в физиологических условиях ЦОГ-1 экспрессируется микроглией и периваскулярными клетками, ЦОГ-2 находится в постсинаптических мембранах дендритов и возбуждающих терминалях, в частности, в коре головного мозга, гиппокампе, миндалевидном теле.

Как ни парадоксально, но экспериментальные данные свидетельствуют о том, что при воспалении, вызванном бактериальными агентами, Aβ, липополисахаридом, ИЛ-1β, ФНО-α, провоспалительной активностью обладает изоформа ЦОГ-1, а противовоспалительными свойствами – ЦОГ-2 [14, 28]. Ингибирование ЦОГ-2 вызывает повышение активности MMP-3 и MMP-9, которые вызывают разрушение базальной мембраны ГЭБ и межклеточных связей эндотелиоцитов, нарушая тем самым проницаемость ГЭБ. Это подтверждает противовоспалительную активность ЦОГ-2 [14]. В то же время при ингибировании ЦОГ-1 происходит уменьшение выраженности воспалительной реакции, миграции лейкоцитов в ткань головного мозга, окислительного стресса и гибели нейронов [14, 22]. Ряд исследователей подтверждают, что в контексте развития воспаления более эффективно блокирование ЦОГ-1, а не ЦОГ-2 [13, 14, 30]. Это делает ЦОГ-1 потенциально важной мишенью при воспалении. При этом требуются дополнительные исследования, которые позволят более точно определить роль как ЦОГ-1, так и ЦОГ-2 в реализации воспаления.

Как было сказано выше, еще одной группой белков, участвующих в развитии нейровоспаления и непосредственно вызывающих повреждение сосудистой стенки и клеток ЦНС, являются ММР. Их физиологическая роль разнообразна: участие в ангиогенезе, ремоделировании тканей, регуляции клеточной пролиферации, миграции, дифференцировки и апоптоза. Они задействованы в протеолизе мембранных рецепторов, активации и деактивации хемокинов и цитокинов [42].

Наиболее хорошо изученными металлопротеиназами, участвующими в развитии нейровоспаления и повреждении ГЭБ, являются ММР-2, ММР-3, ММР-9. В работе [74] показана их роль в патогенезе энцефаломиелита и рассеянного склероза, а также возможность использования ингибиторов ММР-9 для уменьшения выраженности воспаления при этих состояниях. Доказана роль ММР-9 в развитии нейровоспаления, разрушении белков плотных контактов, нарушении проницаемости ГЭБ и развитии вазогенного отека при эпилепсии и холодовой травме. Авторами применялись ингибиторы активации ММР-9 (BQ788, IRL-2500) и была продемонстрирована их эффективность при изучаемой патологии. Похожие результаты получены при применении ингибитора активности ММР-9 бриостатина при инсульте [39, 52, 68].

Существуют данные о том, что развитие нейровоспаления путем активации ММР-2 происходит через p38MAPK/JNK-сигнальный путь при воздействии липополисахаридов. При этом наблюдается снижение экспрессии белков плотных контактов (окклюдина и ZO-1), а также нарушение их структуры. С учетом этих данных ингибиторы ММР-2 могут быть потенциально эффективными при воспалении бактериальной этиологии [43]. Исследования, посвященные антиоксидантным, иммуномодулирующим эффектам, а также противовоспалительной активности биологически активных соединений корня женьшеня (гинзенозиды) выявили, что изучаемые эффекты реализуются через подавление активности ММР-9. В частности, в условиях воспаления и при гипоксически-ишемических поражениях ЦНС при действии гинзенозида Rb1 наблюдается уменьшение интенсивности окислительного стресса, подавление экспрессии провоспалительного цитокина ИЛ-1β и активности NO-синтазы с одновременным усилением экспрессии противовоспалительных молекул (ИЛ-10, аргиназа) [21]. Сходные результаты были продемонстрированы в исследованиях эффективности H_2S при гипоксически-ишемическом поражении ЦНС у экспериментальных животных [29, 76].

В работе, посвященной исследованию нейропротекторного эффекта 17β-эстрадиола, было убедительно показано, что уменьшение гибели клеток головного мозга, сохранение проницаемости ГЭБ, стабилизация белков плотных контактов при заболеваниях ЦНС связаны с угнетением активности ММР-1, а также уменьшением активности и экспрессии генов, кодирующих ММР-2, ММР-3, ММР-9, ММР-10 и ММР-13 [54]. Это говорит о том, что эстрогены могут найти применение как стабилизаторы ГЭБ, тогда как сами матриксные металлопротеиназы следует воспринимать как перспективные молекулы-мишени.

Еще одним доводом в пользу использования ингибиторов матриксных металлопротеиназ при воспалении является работа, посвященная изучению биологических эффектов N-гидрокси-N-(4-бутил-2-метилфенил) формамидина (HET0016). Это вещество блокирует активность ММР-9, что сопровождается редуцированием отека головного мозга и степени выраженности повреждения ГЭБ. Позднее было установлено, что HET0016 дополнительно блокирует JNK-сигнальный путь, а также восстанавливает экспрессию клаудина-5 и белка ZO-1 в эндотелиоцитах церебральных сосудов [47].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение клеточно-молекулярных механизмов нарушения структурной и функциональной целостности ГЭБ при заболеваниях ЦНС (гипоксически-ишемическое поражение, травма, нейродегенерация, нарушения развития головного мозга) определяют прогресс в разработке новых фармакотерапевтических подходов к коррекции воспаления, являющегося неотъемлемым компонентом сложного патогенеза этих состояний. Применение современных экспериментальных моделей нейровоспаления на животных, моделей ГЭБ *in vitro*, воспроизводящих ключевые механизмы развития нейровоспаления, а также использование высокоинформативных аналитических методов позволяет идентифицировать новые молекулы-мишени для действия фармакологических веществ.

Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-25-00054).

ЛИТЕРАТУРА

1. Д. В. Блинов, *Фармакоэкономика. Совр. фармакоэконом. и фармакоэпидемиол.*, № 1, 40 – 45 (2014).
2. Д. В. Блинов, *Акушерство, гинекол. и репродукция*, № 3, 34 – 38 (2012).
3. Г. С. Голосная, А. В. Яковлева, Л. В. Филякова, *Вестник Ивановской мед. академии*, **18**(4), 60 – 61 (2013).
4. А. И. Жебентяев, Е. Н. Каткова, *Вестник фармации*, **2**(60), 90 – 97 (2013).

5. М. Л. Занавескин, А. А. Миронова, А. М. Попов, *Молек. медицина*, № 5, 9 – 16 (2012).
6. А. О. Иванцов, Д. Е. Мацко, *Практ. онкология*, **12**(4), 185 – 193 (2011).
7. А. А. Кучмий, Г. А. Ефимов, С. А. Недоспасов, *Биохимия*, **77**(12), 1603 – 1620 (2012).
8. А. Т. Лебедев, В. Г. Заикин, *Заводская лаборатория. Диагностика материалов*, **73**(2), 21 – 30 (2007).
9. А. Т. Лебедев, *Масс-спектрометрия для анализа объектов окружающей среды*, Техносфера, Москва (2013).
10. Е. М. Мазаева, Л. А. Алексеева, Н. В. Скрипченко, Т. В. Бессонова, *Здоровье – основа человеческого потенциала – проблемы и пути их решения*, № 2, 605 – 606 (2013).
11. В. В. Пилипенко, *Автореф. дис. докт. мед. наук*, Санкт-Петербург (2011).
12. Т. Е. Таранушенко, О. С. Окунева, И. М. Демьянова и др., *Педиатрия*, **89**(1), 25 – 31 (2010).
13. S. Aid, A. C. Silva, E. Candelario-Jalil, et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **30**(2), 370 – 380 (2010).
14. S. Aid, F. Bosetti, *Biochimie*, **93**(1), 46 – 51 (2011).
15. P. An, Y. X. Xue, *Brain Res.*, № 1272, 81 – 88 (2009).
16. N. T. Ashley, Z. M. Weil, R. J. Nelson, *Ann. Rev. Ecol.*, *Evolut.*, *and Systematics*, № 43, 385 – 406 (2012).
17. G. Barreto, R. E. White, Y. Ouyang, et al., *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, **11**(2), 164 – 173 (2011).
18. E. Beurel, S. F. Grieco, R. S. Jope, *Pharmacol. Ther.*, № 148, 114 – 131 (2015).
19. J. F. Chen, F. Pedata, *Cur. Pharm. Des.*, **14**(15), 1490 – 1499 (2008).
20. N. Chen, W. Chunhui, Zh. Jingjing, et al., *Am. J. Pathol.*, № 12, 3308 – 3320 (2014).
21. W. Chen, Y. Guo, W. Yang, et al., *Exp. Brain Res.*, 2015 Epub ahead of print (2015); http: // link.springer.com / article / 10.1007%2Fs00221 – 015 – 4352 – 3
22. S. H. Choi, S. Aid, U. Choi, F. Bosetti, *Pharmacogenomics J.*, **10**(5), 448 – 457 (2010).
23. C. Coisne, B. Engelhardt, *Antioxid. Redox. Signal*, **15**(5), 1285 – 1303 (2011).
24. A. C. C. Da Fonseca, D. Matias, C. Garcia, et al., *Front. Cell. Neurosci.*, № 8, 362 (2014); http: // doi.org / 10.3389 / fncel.2014.00362.
25. N. D'Ambrosi, S. Rossi, V. Gerbino, M. Cozzolino, *Front. Cell. Neurosci*, № 8, 279 (2014).
26. C. Davies, C. Tournier, *Biochem. Soc. Trans*, **40**(1), 85 – 89 (2012).
27. X. Fan, C. J. Heijnen, M. A van der Kooij, et al., *Brain Res. Rev.*, **62**(1), 99 – 108 (2009).
28. M. Font-Nieves, M. G. Sans-Fons, R. Gorina, et al., *J. Biol. Chem.*, **287**(9), 6454 – 6468 (2012).
29. Y. Geng, E. Li, Q. Mu, et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **35**(3), 494 – 500 (2015).
30. B. Germann, W. Neuhaus, R. Hofer-Warbinek, C. R. Noe, *Pharmazie*, **63**(4), 303 – 307 (2008).
31. M. Golpich, E. Amini, F. Hemmati, et al., *Pharmacol. Res.*, № 97, 16 – 26 (2015).
32. R. Gorina, M. Font-Nieves, L. Márquez-Kisinousky, et al., *Glia*, **59**(2), 242 – 255 (2011).
33. M. E. Hamby, M. V. Sofroniew, *Neurotherapeutics*, **7**(4), 494 – 506 (2010).
34. R. Harati, A. S. Villégier, W. A. Banks, A. Mabondzo, *J. Neuroinflammation*, № 9, 273 (2012); doi: 10.1186 / 1742 – 2094 – 9-273.
35. M. T. Heneka, M. P. Kummer, E. Latz, *Nat. Rev. Immunol.*, **14**(7), 463 – 477 (2014).
36. S. H. Huang, L. Wang, F. Chi, et al., *PLoS One*, **8**(4), e62164 (2013).
37. H. Jiang, X. Weng, D. Li, et al., *Microfluidics Nanofluidics*, № 10, 941 – 964 (2011).
38. T. C. Karlenius, K. F. Tonissen, *Cancers* (Basel), **2**(2), 209 – 232 (2010).
39. J. Y. Kim, A. R. Ko, H. W. Hyun, T. C. Kang, *Neuroscience*, № 304, 355 – 367 (2015).
40. G. Kooij, K. Kopplin, R. Blasig, et al., *Acta Neuropathol.*, № 128, 267 – 277 (2014).
41. V. Kundumani-Sridharan, J. Subramani, K. C. Das, *J. Biol. Chem.*, **290**(28), 17505 – 17519 (2015).
42. S. E. Lakhan, A. Kirchgessner, D. Tepper, et al., *Front. Neurol.*, № 4, 32 (2013); doi: 10.3389 / fneur.2013.00032.
43. L. H. Qin, W. Huang, X. A. Mo, et al., *Oxid Med. Cell Longev.*, № 2015, 120641 (2015); doi: 10.1155 / 2015 / 120641.
44. A. Leviton, P. Gressens, O. Wolkenhauer, O. Dammann, *Front. Syst. Neurosci.*, № 9, 58 (2015).
45. L. Li, D. W. McBride, D. Doycheva, et al., *Exp. Neurol.*, S0014 – 4886(15)00005 – 9 (2015); doi: 10.1016 / j.expneurol.2014.12.020. [Epub ahead of print].
46. H. Y. Lin, C. L. Wu, C. C. Huang, *Stroke*, **41**(7), 1543 – 1551 (2010).
47. Y. Liu, D. Wang, H. Wang, et al., *Brain Res.*, № 1544, 45 – 53 (2014).
48. E. Lorenzetto, M. Ettorre,, V. Pontelli, et al., *PLoS One*, № 8, e64350 (2013).
49. T. Mahmood, P. C. Yang, N. Am. *J. Med. Sci.*, **4**(9), 429–434 (2012).
50. X. W. Mao, C. S. Pan, P. Huang, et al., *Sci. Rep.*, **10**(5), 11155 (2015).
51. U. Marx, H. Walles, S. Hoffmann, et al., *Altern. Lab. Anim.*, **40**(5), 235 – 257 (2012).
52. S. Michinaga, N. Seno, M. Fuka, et al., *Eur. J. Neurosci.*, (2015); doi: 10.1111 / ejn.13020. Epub ahead of print.
53. A. Mukherjee, S. G. Martin, *Br. J. Radiol. Spec.*, № 1, 57 – 68 (2008).
54. W. Na, J. Y. Lee, W. S. Kim, et al., *Mol. Endocrinol.*, **29**(9), 1347 – 1361 (2015).
55. Z. Nayernia, V. Jaquet, K..H. Krause, *Antioxid. Redox Signal.*, **20**(17), 2815 – 2837 (2014).
56. N. A. Northrop, B. K. Yamamoto, *Neuroimmune Pharmacol.*, **7**(4), 951 – 968 (2012).
57. W. Pan, C. Yu, H. Hsuchou, et al., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **294**(6), 1436 – 1442 (2008).
58. A. Petry, R. S. BelAiba, M. Weitnauer, A. Görlach, *Thromb. Haemost.*, **108**(5), 849 – 862 (2012).
59. S. H. Ramirez, S. Fan, H. Dykstra, et al., *PLoS One*, **8**(2), e55972 (2013).
60. A. Reiss, J. S. Braun, K. Jager, et al., *J. Infect. Dis.*, **203**(3), 393 – 400 (2011).
61. M. M. Ribeiro, M. A. Castanho, I. Serrano, *Mini Rev. Med. Chem.*, **10**(3), 262–270 (2010).
62. D. A. Ridder, J. Wenzel, K. Müller, et al., *J. Exp. Med.*, (2015), pii: jem.20150165. [Epub ahead of print].
63. S. Rom, S. Fan, N. Reichenbach, et al., *Am. J. Pathol.*, **181**(4), 1414 – 1425 (2012).
64. C. Schwab, A. Klegeris, P. L. McGeer, *Biochim. Biophys. Acta*, **1802**(10), 889 – 902 (2010).
65. S. Shi, W. Yang, X. Tu, et al., *Neural. Regen Res.*, **8**(7), 633 – 638 (2013).
66. M. V. Sofroniew, *Neuroscientist*, **20**(2), 160 – 172 (2014).
67. Y. Tan, L. Bi, P. Zhang, et al., *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, **7**(8), 4765 – 4773 (2014).
68. Z. Tan, B. Lucke-Wold, A. F. Logsdon, et al., *Eur. J. Pharmacol.*, № 764, 404 – 412 (2015).
69. S. Tietz, B. Engelhardt, *J. Cell Biol.*, **209**(4), 493 – 506 (2015).
70. M. K. Tobin, J. A. Bonds, R. D. Minshall, et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **34**(10), 1573 – 1584 (2014).

71. L. Tönges, R. Günthe, M. Suhr, et al., *Glia*, **62**(2), 217 – 232 (2014).
72. S. Travaglione, S. Loizzo, G. Ballan, et al., *Toxins* (Basel), **6**(1), 270–282 (2014).
73. K. A. Trumbul, D. McAllister, Gandelman, et al., *Neurobiol. Dis.*, **45**(1), 137–144 (2012).
74. J. Vandooren, J. Van Damme, G. Opdenakker, *Prog. Brain Res.*, № 214, 193 – 206 (2014).
75. A. Vercelli, S. Biggi, A. Sclip, et al., *Cell Death Dis.*, № 6, e1854 (2015).
76. Y. Wang, J. Jia, G. Ao, et al., *J. Neurochem.*, **129**(5), 827 – 838 (2014).
77. A. Weidemann, J. Breyer, M. Rehm, et al., *Cell Commun. Signal.*, № 11, 80 (2013).
78. R. C. Winger, J. E. Koblinski, T. Kanda, et al., *J. Immunol.*, **193**(5), 2427 – 2437 (2014).
79. C. Xing, K. Hayakawa, J. Lok, et al., *Neurol. Res.*, **34**(4), 325 – 330 (2012).
80. Y. Xu, K. Jang, T. Yamashita, et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, **402**(1), 99–107 (2012).
81. F. Yang, L. Zhou, D. Wang, et al., *Neuroscience*, № 304, 250 – 259 (2015).
82. W. L. Yeh, D. Y. Lu, C. J. Lin., et al., *Mol. Pharmacol.*, **72**(2), 440 – 449 (2007).
83. W. Yin, A. P. Signore, M. Iwai, et al., *Stroke*, **38**(3), 1017 – 1024 (2007).
84. S. R. Yusof, A. Avdeef, N. Abbott, *Eur. J. Pharm. Sci.*, № 65, 98 – 111 (2014).
85. Y. Zhan, P. R. Krafft, T. Lekic, et al., *J. Neurosci. Res.*, **93**(1), 94 – 103 (2015).

Поступила 14.07.15

CURRENT OPPORTUNITIES IN THE IDENTIFICATION OF NOVEL MOLECULAR TARGETS FOR PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF BLOOD-BRAIN BARRIER PERMEABILITY

A. V. Morgun, V. A. Ruzaeva, E. B. Boitsova, T. E. Taranushenko, G. P. Martynova, A. Tohidpour, and A. B. Salmina

V. F. Voino-Yasenetsky Krasnoyarsk State Medical University, Ministry of Public Health of the Russian Federation, ul. P. Zheleznyaka 1, Krasnoyarsk, 660022 Russia

Review covers current achievements in the methodology of target discovery and validation for the development of drugs restoring structural and functional integrity of the blood-brain barrier (BBB) in cases of brain injury and neuroinflammation. Some new targets (in the context of BBB permeability) are discussed, which are involved in the regulation of signal transduction involving HIF-1, JNK, NF-kB, Rac,1 etc., expression of tight-junction proteins, and activity of enzymes producing molecules with pro-inflammatory effects in the BBB cells.

Keywords: brain; neuroinflammation; ischemia; blood-brain barrier; permeability; molecular targets; pharmacotherapy.