

Роль D-аминокислот в патогенезе нейродегенеративных заболеваний и при нормальном старении

А.В. Червяков, М.Н. Захарова, Н.Б. Пестов

ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН;

ФГБУ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (Москва)

Недавние исследования показали, что D-аминокислоты широко представлены в тканях высших организмов, в том числе человека. Определены специфические функции отдельных D-аминокислот в здоровом организме: так, D-серин играет важную роль в нейропластичности, процессах памяти, обучения, а D-аспартат вовлечен в процессы развития и эндокринные функции. Патогенность D-аминокислот связана с гиперактивацией NMDA-рецепторов глутамата, изменением конформации нормальных белковых молекул при встраивании в полипептидную цепь, повышением концентрации активных форм кислорода при оксидатном метаболизме D-аминокислот. Оценка уровня D-аминокислот в биологических жидкостях, а также определение активности ферментов их метаболизма и мутаций кодирующих их генов могут служить диагностическим маркером при некоторых заболеваниях ЦНС (болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз и др.). Практический интерес к содержанию D-аминокислот и их функциям связан также с возможностями разработки новых терапевтических стратегий, направленных на коррекцию синтеза/деградации D-аминокислот и модуляцию активности соответствующих рецепторов.

Ключевые слова: D-аминокислоты, NMDA-рецепторы, нейродегенеративные заболевания, старение.

Введение

В 1848 г., изучая физические свойства винной кислоты, Луи Пастер обнаружил, что кислота, полученная при брожении, отличается по своим свойствам от химически синтезированной изомерной ей молекулы. Изучая кристаллы кислоты под микроскопом, он выделил два их типа, являющихся «зеркальным» отражением друг друга. Образец, состоящий из кристаллов одного типа, поворачивал плоскость поляризации по часовой стрелке, а другого — против. Пастер пришел к заключению, что кристаллы состоят из молекул различной структуры. Химические реакции создают оба их типа с одинаковой вероятностью, однако живые организмы используют лишь один из них. Таким образом, впервые была показана *хиральность* молекул — отсутствие симметрии относительно правой и левой стороны. Как было открыто позже, тем же свойством обладают и аминокислоты [10, 151, 152]. Позже было продемонстрировано, что оптическая активность обусловлена, прежде всего, свойствами молекул и молекулярных структур по отношению к операции зеркального отражения [114, 184].

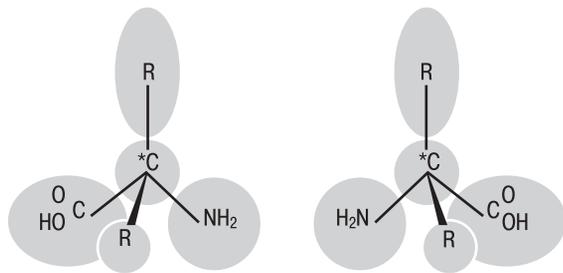


рис. 1: Пространственная структура двух оптических изомеров молекулы с одним асимметричным центром C* [1].

На рис. 1 показаны зеркальные изоформы молекулы аминокислоты, тетраэдрическая структура которой содержит асимметричный центр — атом углерода C*, связанный с четырьмя разными заместителями. Как известно, из таких молекул-звеньев построены белковые полимерные цепи, образующие белки-ферменты [1]. Если молекула имеет один асимметричный центр, то существуют только два оптических зеркальных ее изомера, которые называются энантиомерами и обозначаются соответственно как L (левый) и D (правый). Если же молекула содержит N асимметричных центров, то всего имеется 2^N ее оптических изомеров. Раствор, содержащий только один энантиомер, обладает максимальной оптической активностью и называется оптически чистым [1].

Таким образом, Пастер пришел к выводу о том, что молекулярная основа жизни асимметрична [151, 152]. В природе ведущей физической основой асимметрии является слабое взаимодействие, «отдающее предпочтение», в частности, L-аминокислотам и D-сахарам [126, 127]. В живой клетке энантиомерный контроль осуществляется на системном уровне: определенные группы ферментов разрушают «неприродные» энантиомеры, возникающие спонтанно — в процессе старения либо под действием вредных экологических факторов, например, ионизирующего излучения [7, 21, 92]. Определенные группы ферментов там, где это необходимо, выполняют стереоспецифические функции [4].

Механизмы действия некоторых лекарств основаны на том, что разные энантиомерные формы одного и того же препарата могут привести к прямо противоположным результатам [1]. Известен случай трагических последствий игнорирования этого обстоятельства, когда испытания оптически чистой формы талидомида дали хорошие результаты, а выпуск рацемической (смешанной) формы этого привел к массовым тяжелейшим заболеваниям. Как потом выяснилось, виной всему оказался другой энантиомер, который тоже обладал сильной, но «отрицательной» биологической активностью. Еще пример: широко известный противо-

паркинсонический препарат L-ДОПА применяется только в данной оптической форме, так как D-энантиомер просто не проникает через гематоэнцефалический барьер [1].

До настоящего времени считалось, что все живые организмы содержат и используют в своей жизнедеятельности только L-аминокислоты, а D-аминокислоты элиминировались на заре возникновения жизни. В этой связи наличие и функция D-аминокислот в живых организмах долгое время оставались неочевидными [38]. Первые данные о наличии D-аминокислот в тканях животных выявлены у амфибий и беспозвоночных. Методом хроматографии свободный D-аланин был выделен из крови некоторых насекомых [20], а впоследствии стали появляться работы, описывающие наличие D-аланина, D-глутамата, D-орнитина, D-серина, D-аспарагина, D-цистеина и др. [23, 39, 111, 158] в составе полипептидов у животных. Было сделано предположение, что D-аминокислоты у млекопитающих появились из продуктов жизнедеятельности эндогенной флоры или при спонтанной рацемизации L-аминокислот в структуре полипептидов в процессе старения [83].

Исследования, выполненные на млекопитающих, показали наличие D-аспарагиновой кислоты (D-аспартата) в различных тканях организма, например в хрусталике [63, 128], головном мозге [160, 174], а также зубах, коже, костях, аорте, эритроцитах, легких и связках при старении [64]. D-серин был найден в структуре β -амилоида при болезни Альцгеймера (БА) [97, 160]. Некоторые D-аминокислоты присутствуют в тканях ЦНС млекопитающих и на периферии в неожиданно высоких концентрациях, иногда в более высоких, чем их L-энантиомеры [76]. Эти D-аминокислоты выполняют в организме специфические функции: так, D-серин играет важную роль в нейротрансмиссии, а D-аспартат – в процессе развития и эндокринной регуляции. Изменение уровня D-аминокислот может быть связано с различными патологическими состояниями.

По мнению ряда исследователей, появление асимметрии аминокислот на определенном этапе эволюции является ключевым в образовании первичных живых клеток на планете, а хиральность – фундаментальная основа асимметрии всех живых организмов [1, 3, 12–16, 32].

Распространенность и физиологическая роль D-аминокислот в норме и при нормальном старении

В настоящее время для определения уровня D-аминокислот могут применяться ЯМР-спектроскопия, измерение оптической активности, рентгеноструктурный анализ, иммуногистохимические и разнообразные биосенсорные методы [2, 15, 61, 103, 153, 188]. Уровни D-аминокислот сильно зависят от возраста животных. D-аспартат показывает достоверно повышенные концентрации в ЦНС. В течение эмбрионального развития крыс D-аспартат первым появляется в коре мозга, стриатуме, среднем мозге, промежуточном мозге и мозжечке. Его низкие концентрации зафиксированы в мосту и в продолговатом мозге [165, 193]. Концентрация D-аспартата в лобной коре мозга человека на 14-й неделе гестации превышает концентрацию L-формы [73]. С возрастом концентрация D-аспартата снижается в крови, сетчатке, надпочечниках, шишковидной железе и семенниках [71, 143].

D-аланин, D-лейцин, D-пролин и D-глутамат также были идентифицированы в мозге млекопитающих [70, 102].

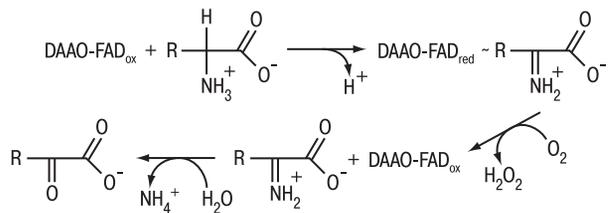


рис. 2: Реакция ферментативного окислительного дезаминирования D-аминокислот.

D-глутамат был выделен из печени и почек, где его концентрации превышали концентрацию D-аспартата [102]. Различные D-аминокислоты найдены у человека в сыворотке крови, моче, ликворе, амниотической жидкости с наибольшими концентрациями в моче и с наименьшими в амниотической жидкости и ликворе. Концентрации D-аминокислот были менее 1% от концентрации L-аминокислот [19]. D-серин также был идентифицирован в значительных количествах в мозге грызунов и человека [77].

Источники, метаболизм и деградация D-аминокислот. D-аминокислоты поступают в организм млекопитающих с пищей при метаболизме кишечной флоры, а также в результате спонтанной рацемизации при старении и биосинтезе [105–107]. Деградация этих соединений происходит путем окислительного дезаминирования оксидазой D-аминокислот (DAAO) [202] с последующим неферментативным гидролизом (рис. 2) [15]. Характерной особенностью всех DAAO является высокая специфичность именно к D-изомерам аминокислот, но не к L-формам.

Впервые DAAO была описана Н.А. Krebs в 1935 г. [110]. Этот фермент группирован из рацемизированных АК и аккумулирован в мозге [113]. Также этот фермент встречается в других белках и представлен в зубах, костях, аорте, коже и легких, т.е. распространен в природе – от микроорганизмов до млекопитающих. DAAO широко экспрессируется у млекопитающих, особенно в почках, печени и ЦНС, наименьшие его концентрации отмечаются в периферических тканях [15, 199]. У микроорганизмов DAAO обеспечивает использование экзогенных D-аминокислот в качестве источника углерода, азота и энергии. У эукариот его роль заключается в поддержании определенного уровня D-аминокислот в клетке. Установлено, что наличие избыточного количества некоторых D-аминокислот в мозге мышей способствует длительной потенциации в гиппокампе и пространственному обучению: при экспериментах в водном лабиринте Морриса мутантные мыши, лишенные гена *DAAO*, обучались значительно быстрее, чем нормальные особи [123].

Физиологические функции D-аминокислот. Значительное число исследований посвящены изучению роли D-серина в качестве нейромодулятора рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA), которые играют важную роль во многих патофизиологических процессах. Свободный D-серин был найден в различных отделах мозга грызунов и человека – переднем мозге, церебральной коре, гиппокампе, стриатуме, лимбическом мозге, промежуточном и среднем мозге и в более низких концентрациях – в мосту, продолговатом мозге, мозжечке и спинном мозге [73, 139]. Концентрация D-серина в мозге крыс составляла 1/3 от концентрации L-серина. Наибольшая концентрация D-серина зафиксирована в астроцитах.

У грызунов концентрация D-серина повышается на 3-й неделе после рождения в коре большого мозга, в мозжечке уровень D-серина начинает повышаться на 1-й неделе постнатального развития и достигает наивысших значений ко 2-й неделе [78, 87]. В мозге человека наивысшие концентрации D-серина определены в лобной коре на 14-й неделе гестации и остаются на этом уровне до момента рождения [76]. Далее уровень D-серина постепенно снижается с возрастом [73]. Наибольшее значение в появлении D-серина играет его биосинтез под действием специфического фермента — серин-рацемазы, превращающей L-форму в D в присутствии пиридоксальфосфата, ионов магния и АТФ [47, 164, 194].

NMDA-рецепторы являются ключевыми возбуждающими рецепторами в головном мозге и вовлечены в формирование памяти, синаптическую пластичность, процессы развития и др. [37, 46, 149]. Их активация приводит к повышению проницаемости мембраны клетки для ионов кальция (Ca^{2+}) [46]. Гиперстимуляция NMDA-рецепторов приводит к формированию эффекта *эксайтотоксичности* — одного из фундаментальных понятий в современных нейронауках [33]. Глутамат является главным агонистом NMDA-рецепторов, но он не активирует рецепторы, если не происходит связывание ко-агонистов с активным сайтом рецептора — NR1 [94, 130]. D-серин, как предполагается, является физиологическим лигандом NMDA-рецепторов, связывающимся в качестве вышеупомянутого ко-агониста с активным сайтом, что приводит к запуску NMDA-опосредованных процессов [69, 96, 195, 200]. Ко-агонистом сайта NMDA-рецептора может также являться и глицин. Его связывание повышает афинность рецептора к глутамату [50], снижает его десенсибилизацию [115] и производит обновление NMDA-рецептора при его интернализации [145].

По сравнению с глицином D-серин — лиганд с высокой степенью сродства к NMDA-рецептору, и его афинность втрое выше, чем афинность глицина [66, 129]. Эндогенный D-серин участвует в нескольких NMDA-зависимых физиологических и патологических процессах, включая нормальную NMDA-рецепторную передачу сигнала, синаптическую пластичность [69, 96, 136, 148, 200], миграцию клеток [104] и нейротоксичность [98, 99, 196]. Структурное обоснование селективного эффекта D-серина на NMDA-рецепторы стало ясным после изучения пространственной структуры центра связывания NR1-субъединицы NMDA-рецептора. D-серин связывается с рецептором более плотно в сравнении с глицином, так как формирующиеся три дополнительные водородные связи вытесняет молекулу воды из центра связывания [66].

Наибольшие концентрации D-серина в мозге крысы определены в переднем обонятельном ядре, коре мозга, гиппокампе, молекулярном слое коры мозжечка, обонятельном бугорке, полосатом теле, таламусе [168]. Содержание D-серина в мозге составляет 1/3 от содержания L-серина, и его концентрация максимальна среди всех D-аминокислот [73]. В отличие от L-аминокислот, D-серин не включается в белки. Данные микродиализа показали, что внеклеточная концентрация D-серина в стриатуме в два раза выше, чем глицина, а в коре мозга — сопоставима с концентрацией глицина [75].

A. Hashimoto et al. впервые показали, что D-серин широко представлен в переднем мозге крыс, как и NMDA-рецепто-

ры [73]. Региональная представленность D-серина в других отделах мозга также соотносится с распространением NMDA-рецепторов [169, 170]. Концентрация D-серина ниже в каудальной части мозга, включая мозжечок и ствол, что связано с активностью DAAO у взрослых животных в этих регионах [86, 170]. В отличие от D-серина, иммунореактивность глицина выше в каудальных отделах мозга [168].

Как предполагается, D-серин содержится в цитоплазме астроцитов и оттуда поступает в синаптическую щель [168, 169]. Для подтверждения роли D-серина как ко-агониста глутамата в работе NMDA-рецепторов на культуре клеток смоделировали отсутствие D-серина с помощью фермента DAAO, избирательно разрушающего D-аминокислоты. В таком эксперименте на 60% снизилась спонтанная активация NMDA-рецепторов на постсинаптической мембране, в то время как ответ от AMPA-рецепторов не изменился [136]. Более того, D-серин по сходному механизму способствовал продолжительной синаптической активации в нейронах гиппокампа — нейрофизиологическому аналогу процессов запоминания и обучения [96, 136, 195].

D-серин синтезируется из L-серина под действием серин-рацемазы [47, 192]. Предварительные исследования показали, что у линии трансгенных мышей с «нокаутированным» геном серин-рацемазы зафиксировано снижение концентрации D-серина в мозге на 80–90% [22, 121, 137, 203]. Также у этих мышей зафиксировано снижение передачи сигнала через NMDA-рецепторы, ухудшение длительного потенцирования синаптической активности в гиппокампе, животные этой линии были более устойчивыми к ишемии мозга после окклюзии средней мозговой артерии [121, 137]. В последнее время стали появляться данные, что D-серин и D-серин-рацемазы также встречаются в нейронах переднего мозга (при недостатке DAAO), в пирамидных нейронах [108, 201].

В ЦНС D-аспартат может потенцировать NMDA-рецепторы посредством стимуляции глутаматного сайта рецептора [45, 51], но сродство NMDA-рецептора к D-аспартату в 10 раз ниже, чем к L-глутамату [51], и локализация D-аспартата не коррелирует с распределением NMDA-рецепторов [169]. D-аспартат может, однако, усиливать активность NMDA-рецепторов после ферментного метилирования метилтрансферазой [45]. D-аспартат участвует в секреции ряда гормонов — тестостерона [42, 45, 138], окситоцина [185], мелатонина [179], соматотропного и лютеинизирующего гормонов [185] и др. D-аспартат в значительных количествах присутствует в тканях головного мозга, причем его концентрация увеличивается со скоростью до 0,14% в год [125, 156]. Наиболее высокая концентрация D-аспартата наблюдается в железах внутренней секреции [49, 65]. Содержание D-аспартата также увеличивается с возрастом в хрусталике, дентине, коленном хряще и белом веществе головного мозга [60, 84, 124].

Показана роль D-аминокислот в регуляции артериального давления. NG-нитроаргинин существует в клетке в виде L- и D-изомеров, причем изначально синтезируется NG-нитро-D-аргинин, из которого затем образуется L-форма. Оба соединения причастны к повышению артериального давления, однако реакция организма на D-изомер значительно медленнее и слабее, чем в случае L-формы [187]. Активность NG-нитро-D-аргинина связана с тем, что он является высокоэффективным ингибитором фермента NO-синтазы [186] — одного из ключевых

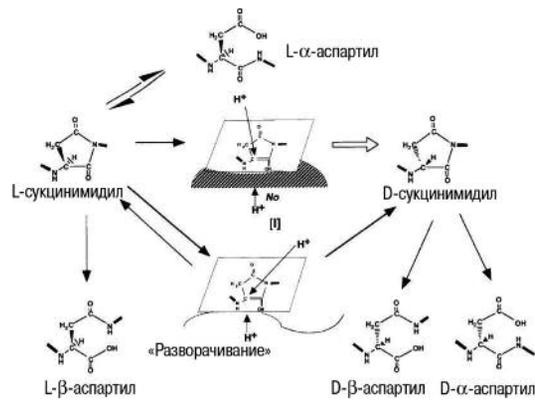


рис. 3: Неферментная рацемизация аспартата.

регуляторов различных процессов в клетке [8]. Пролонгированное действие NG-нитро-D-аргинина обусловлено достаточно медленным процессом его рацемизации в почках. Установлено, что одним из основных ферментов, катализирующих процесс рацемизации NG-нитро-D-аргинина, является почечная DAAO [198]. D-аргинин также играет роль в орнитинном цикле [163].

D-аминокислоты при нормальном старении. Количественное соотношение L/D энантиомеров изменяется в процессе развития и старения организма. При старении основную роль играет рацемизация L-аминокислот с переходом их в D-форму, причем в наибольшей степени подвержена рацемизации аспарагиновая кислота. Накопление D-аминокислот в белках приводит к изменению третичной и четвертичной структуры белка и, следовательно, снижению его функциональной активности [62, 64]. D-аспарат найден при катаракте в хрусталике, в головном мозге при БА и в стенке аорты при атеросклерозе у пожилых доноров [14, 64]. Наиболее часто D-аспарат входит в состав белков А и В-кристаллина [63] и β -амилоида [64]. Неферментативное формирование β -D-аспартата в белках показано на рис. 3 [64, 181].

Эксперименты, проведенные в 1970-х годах, четко показывают увеличение содержания D-аминокислот в белках тканей организмов человека и животных в процессе старения. Рацемизацию ускоряет действие ультрафиолетового излучения. В организме 60-летних людей около 8% всей аспарагиновой кислоты находится в D-форме. D-аспарат в фрагментах коллагена типа I найден в моче пожилых людей. Показана связь уровня D-серина и серин-рацемазы в гиппокампе стареющих мышей с показателями пролонгированной потенциации синаптической активности [96, 136]. В клетке концентрация D-пролина вместе с D-лейцином находится на 4-м месте после D-серина, D-аспартата и D-аланина [71, 153]. В клетках долгоживущих тканей (дентин, зубная эмаль, кристаллики и др.) наблюдается четкая корреляция между возрастом человека и концентрацией D-оксипролина и D-аспартата [15]. Активно обсуждаются данные о нейро-, гепато- и нефротоксичности D-пролина для крыс [171]. Изучение содержания D-пролина в различных тканях обычных и мутантных мышей (с отсутствием гена *daao*) показало, что у последних D-пролин в значительных количествах накапливается в почках, а его избыток выводится из организма естественным путем [71].

D-аминокислоты при патологии головного и спинного мозга

D-аминокислоты и боковой амиотрофической склероз (БАС). БАС – хроническое неуклонно прогрессирующее заболевание нервной системы, характеризующиеся массивной гибелью мотонейронов, появлением специфических включений в мотонейронах и астроцитах, а также глиозом в передних рогах спинного мозга [30]. Приблизительно 90% случаев БАС являются спорадическими, но 10% имеют наследственную природу. Около 20% наследственных случаев имеют мутацию в гене, кодирующем фермент супероксиддисмутазу-1 (СОД1) [161]. Среди нескольких теорий патогенеза БАС теория глутаматной эксайтотоксичности представляется наиболее обоснованной [30, 183]. Она подтверждена наблюдениями, согласно которым в ликворе у 40% пациентов с БАС зафиксировано трехкратное повышение уровня глутамата в результате снижения его захвата астроцитами [162]. При семейных и спорадических формах БАС выявлены угнетение глутаматного транспорта [162], нарушение различных звеньев метаболизма данного медиатора [41] и повышенная чувствительность нейронов к глутамат-опосредованным эксайтотоксическим эффектам [89, 162].

У 70% больных спорадической формой БАС имеется глубокий дефицит астроцитарного глутаматного транспортера EAAT2 в моторной коре и спинальных мотонейронах, обусловленный нарушением процессинга мРНК и синтезом аномального белкового продукта, подвергающегося быстрой деградации с потерей активности [117]. Предполагается, что данный молекулярный дефект может быть результатом окислительного повреждения ДНК и белков, регулирующих транскрипцию гена *EAAT2* в периферических и центральных мотонейронах [117].

С позиций предотвращения эксайтотоксичности объясняется действие ингибитора глутамата рилузола – единственного препарата, показавший свою клиническую эффективность при БАС. Кроме того, снижение транспортеров глутамата зафиксировано на модели БАС у мышей с мутацией в гене *СОД1* [88]. Однако детали механизмы глутаматной эксайтотоксичности в мотонейронах остаются неизученными.

Известны три класса интотропных глутаматных рецепторов: рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDA), рецепторы α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолеропроеиноновой кислоты (AMPA) и каинатные рецепторы [183]. AMPA-рецепторы играют ключевую роль в БАС-ассоциированной глутаматной эксайтотоксичности, существенное значение имеют также NMDA-рецепторы [100]. D-серин – физиологически доминантный ко-агонист специфической части глутаматного рецептора (см. выше) [148, 176]. Серин-рацемаза экспрессируется большей частью в клетках глии [192] и участвует в ее активации [196, 197]. Принимая во внимание, что повреждение мотонейронов происходит при активации глии [26, 36, 157], было предположено, что D-серин при БАС генерируется активированной глией и может вносить вклад в развитие глутаматной эксайтотоксичности.

Исследование потенциальной роли D-серина при БАС проводилось на замороженном спинном мозге СОД1-трансгенных мышей на 9-й, 16-й и 21-й неделях. Определено, что концентрация D-серина в спинном мозге повышается по мере прогрессирования заболевания, начиная с досимптомной стадии [95]. D-серин накапливается вокруг вакуо-

лизированных мотонейронов в передних рогах уже в дебюте БАС, что доказывает взаимосвязь между накоплением D-серина и повреждением нейронов. Повышение уровня D-серина наблюдалось не только в сером, но и в белом веществе. D-серин был найден в активированной микроглии и астроцитах на всех стадиях БАС [95].

Уровень D-серина постоянно регулируется его деградацией. Как и другие D-аминокислоты, D-серин может селективно метаболизироваться ферментом DAAO, находящимся в астроцитах. Количество DAAO-позитивных клеток увеличивается при развитии заболевания, но при этом уровень экспрессии DAAO не различается у здоровых мышей и мышей с БАС [182]. Данные результаты дают возможность предположить, что повышение DAAO было недостаточным относительно повышения активности серин-рацемазы, а деградация D-серина ферментом DAAO не могла компенсировать его генерацию серин-рацемазой [95]. Предположено, что повышение концентрации D-серина у мышей с БАС связано именно с дисрегуляцией серин-рацемазы. Кроме того, повышение уровня данной аминокислоты при БАС может свидетельствовать о дисбалансе между продукцией аминокислот в активированной микроглии и выведением/деградацией в астроцитах.

Описаны два основных механизма, приводящих к повышению продукции D-серина глиальными клетками: 1) индукция провоспалительными факторами экспрессии серин-рацемазы в микроглии [196]; 2) стимуляция глутаматом AMPA-рецепторов, что вызывает повышение ферментной активности серин-рацемазы в микроглии.

Для определения вклада мутации *СОD1* в регуляцию серин-рацемазы клетки были инфицированы аденовирусами, кодирующими нормальный тип *СОD1* и мутацию G93A-*СОD1* в микроглии. Установлено, что экспрессия G93A-*СОD1*, но не нормального типа *СОD1*, приводит к повышению экспрессии серин-рацемазы, причем данное повышение не ассоциировано с активацией каспазного пути в течение 72 час после инфицирования [95].

Изменения концентрации D-серина были найдены при иммуногистохимическом анализе аутопсийного материала спинного мозга больных БАС. У пациента с семейной формой БАС и в двух из трех случаев спорадического БАС в спинном мозге (как в нейронах, так и в клетках глии) определялись повышенные уровни D-серина. Это подтверждает, что глутаматная токсичность при БАС увеличивается под действием D-серина не только на модели мышей, но и у людей. Также иммуногистохимический анализ показал, что увеличение серинрацемазы-позитивных клеток имело место в двух из трех случаев спорадической формы БАС и не зафиксировано при семейной форме. Найдено увеличение DAAO-позитивных глиальных клеток при БАС в сравнении с контролем [95].

В 2010 г. была обследована семья с наследственной формой БАС, у которой определена новая мутация в гене *DAAO*. Мутация делала этот белок нефункциональным, что приводило к накоплению D-серина в мотонейронах и их дегенерации по описанным выше механизмам [204].

Таким образом, была сформулирована новая гипотеза гибели нейронов при БАС. Повышение активации серин-рацемазы, индуцированной активацией глии или мутацией *СОD1*, повышает концентрацию D-серина в активирован-

ной глие. Повышение D-серина в экстрацеллюлярном пространстве запускает каскад глутаматной эксайтотоксичности в мотонейронах через NMDA-рецепторы.

D-аминокислоты и болезнь Альцгеймера. БА – прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, при котором в клетках пораженного мозга появляется β-амилоид (βA) – ключевой молекулярный маркер патологического процесса. Ингибирование формирования βA является одним из перспективных терапевтических направлений. В этом аспекте были идентифицированы D-аминокислоты, составляющие основу βA. Как известно, D-аминокислоты менее подвержены протеазам и менее иммуногенны, чем L-энантимеры. Показано, что двенадцать D-пептидов входят в состав βA. А.Е. Rohet и соавт. предположили, что βA сгруппирован из рацемизированных аминокислот и аккумулирован в мозге [160]. Позднее было достоверно определено влияние D-аминокислот на полимеризацию βA и его токсичность: наличие D-аминокислот снижает размер βA-агрегатов, но повышает их количество [189].

При БА содержание D-аланина в сером веществе головного мозга примерно в 2,2 раза выше, чем у здоровых людей [42, 54]. В ликворе таких больных отмечено повышенное содержание свободных D-аспартата и D-серина и общего количества D-аминокислот [59]. Данный эффект объясняют совокупным действием двух факторов – снижением активности DAAO и повышением активности соответствующих рацемаз по сравнению с таковыми в организме здорового человека.

При БА выявлено повышение концентрации D-аспартата в ликворе по сравнению с нормой [58], но содержание свободного D-аспартата было достоверно ниже в регионах мозга с патологическими изменениями [44], а также в белом веществе пациентов с БА по сравнению со здоровым мозгом [55]. Общее содержание D-аминокислот в вентрикулярном пунктате в 1,48 раз выше, а в поясничном – в 1,43 раза выше у пациентов с БА по сравнению с контролем. Содержание D-аспартата в вентрикулярном ликворе в 2,74 раза выше, а в поясничном – в 1,5 раза выше у пациентов с БА в сравнении со здоровыми [56]. В многочисленных исследованиях показано, что βA способствует нейродегенерации через стимуляцию микроглии и выделение аминокислот, включая D-серин [59, 175].

D-аминокислоты и шизофрения. Уменьшение концентрации D-серина снижает функциональную активность NMDA-рецепторов, что может быть ассоциировано с развитием шизофрении [35, 37, 40, 67, 72, 82, 144]. В последнее время именно эта гипотеза принята за рабочую, так как в ее пользу свидетельствуют многочисленные экспериментальные данные [122, 147, 172]. Выделены два гена, мутации в которых повышают риск развития шизофрении: 1) ген активатора DAAO на 13-й хромосоме, кодирующей белок G72 – работа этого гена способствует снижению концентрации D-серина и гипофункции NMDA-рецепторов; 2) второй ген, имеющий отношение к регуляции активности DAAO, также находится на 13-й хромосоме. В гиппокампе больных шизофренией экспрессия и активность фермента DAAO в два раза выше, чем в норме, поэтому у пациентов больше D-серина метаболизируется и не участвует в коактивации глутаматных рецепторов. Известен и полиморфный вариант гена серин-рацемазы, который менее активен, что приводит к уменьшению концентрации D-серина в мозге и гипофункции NMDA-рецепторов [11].

Применение антагонистов NMDA-рецепторов, таких как фенциклидин, вызывает шизофреноподобные симптомы здоровых волонтеров [67]. У мышей низкая экспрессия NR1-фрагмента NMDA-рецептора, отвечающего за связывание с глицином и D-серином, приводила к поведенческим нарушениям в виде снижения моторной активности, стереотипий, нарушения межвидового и межполового контакта [133].

У пациентов с шизофренией имеет место высокое значенные отношения L-серина к D-серину в крови и ликворе [25, 79, 80].

D-аминокислоты и болезнь Паркинсона (БП). Роль D-аминокислот в патогенез БП прицельно не изучалась. Считается, что важную роль в развитии данного заболевания, так же как при БА и БАС, играет глутаматная эксайтотоксичность [109]. Методом капиллярного электрофореза показаны отличия уровней D- и L-серина в среднем мозге у мышей с моделью паркинсонизма от нормы [116]. Согласно другим данным, при БП и БА концентрации D-серина в височной, теменной и префронтальных областях достоверно не изменялись [34, 112, 140]. Тем не менее у пациентов с БП антагонисты глициновых сайтов NMDA-рецепторов показали хорошую эффективность при моторных нарушениях [31].

D-аминокислоты и эпилепсия. D-серин усиливает активность антиконвульсантов [154] и повышает порог судорожной готовности [120]. Предполагается, что серин-опосредованная активация NMDA-рецепторов необходима для усиления тормозного воздействия на ГАМК_A-рецепторы, а нарушение данной активации может привести к растормаживанию нейронных сетей и склонности к эпилептическим пароксизмам [134, 141].

D-аминокислоты и другие заболевания. В белках опухолевых клеток содержатся существенные количества D-аминокислот, в частности, D-глутамата, D-валина, D-лейцина и D-лизина [54]. После перинатальной асфиксии D-аспартат интенсивно синтезируется в ЦНС, по-видимому, из его предшественника аланина [159]. Повышение уровня сывороточного D-серина, D-пролина и D-аспарагина и/или D-аспартата ассоциировано со старением и заболеванием почек [29, 138]. Найдена положительная корреляция между концентрацией D-аминокислот и маркеров почечных заболеваний. Уровень D-серина повышается в мозге животных с моделью инсульта одновременно со снижением глицина и L-глутамата [119].

Таким образом, многие D-аминокислоты изменяют свои концентрации при заболеваниях мозга. На сегодняшний момент главным патогенетическим механизмом, в реализации которого участвуют D-формы аминокислот, является глутаматная эксайтотоксичность. Гиперстимуляция NMDA-рецепторов зафиксирована при большом числе острых и хронических заболеваний нервной системы, включая инсульт, эпилепсию, полинейропатию, хроническую боль, БАС, БП, БА и хорею Гентингтона [46]. Все эти факты являются основанием для поиска новых методов диагностики, лечения и профилактики заболеваний, связанных с изменением концентраций D-аминокислот.

Следует отдельно подчеркнуть, что D-аминокислоты имеют прямое отношение к такому универсальному механизму нейрогенерации, как конформационные изменения нейрональных белков [5, 6, 9, 24, 28]. Согласно имеющимся данным, встраивание D-аминокислот в L-полипептидную цепочку приводит к формированию нерегулярной пространственной организации молекулы, цепочка начинает надламываться и изменять свое направление, при

таблица 1: Основные D-аминокислоты в организме животных и человека.

D-аминокислоты	Животное	Локализация (источник)	Происхождение	Функция / ассоциированное заболевание	Источник
D-серин	Грызуны, человек	ЦНС, ликвор, сетчатка, β-амилоидные бляшки в веществе мозга, сыворотка крови, моча	Биосинтез, бактерии кишечника, пища	Модулятор NMDA-рецепторов / все заболевания, связанные с дисфункцией NMDA-рецепторов: БА, болезнь Паркинсона, шизофрения, БАС, эпилепсия, заболевания почек	[64, 164]
D-аспартат	Грызуны, человек	ЦНС (миелин, β-амилоид), ликвор, сетчатка, хрусталик (αβ-кристаллин), различные железы (семенники, надпочечники, шишковидная железа и др.), зубная эмаль, дентин, аорта (эластин), кость (остеокальцин)	Биосинтез, бактерии кишечника, пища	Участвует в процессах роста и развития и эндокринной регуляции / возможное участие в патогенезе заболеваний, ассоциированных с дисфункцией NMDA-рецепторов (БА, атеросклероз, катаракта, эластоз, заболевания почек) и механизмах старения	[64, 164]
D-глутамат	Крысы	Мозг, печень, почки	?	?	[102]
D-аланин	Крысы, человек, мыши с выбитым геном DAAO	Слизистые железы, ЦНС, сыворотка крови, слюна, моча	Бактерии кишечника	БА, старение, заболевания почек	[64, 164, 106, 146, 107, 57, 29, 42, 138]
D-лейцин	Крысы, мыши, мыши с выбитым геном DAAO	ЦНС (шишковидная железа, гиппокамп)	?	?	[70, 71]
D-пролин	Крысы, мыши, мыши с выбитым геном DAAO	ЦНС (шишковидная железа, гипофиз)	?	?	[70, 71]
	Человек	Сыворотка крови, слюна, моча	?	Заболевания почек	[64, 138, 164]
D-метионин	Человек	Сыворотка крови, слюна, моча	Пища	?	[106, 107]
D-аспарагин + D-аспартат	Человек	Сыворотка крови, слюна, моча	?	Заболевания почек	[55, 64, 164]
D-аргинин	Человек	?	?	Участвует в орнитиновом цикле	[64, 164]

этом изменяется и ориентация лигандов [2]. Все это неизбежно приведет к искажению и нестабильности третичной структуры белка. Таким образом, появление D-аминокислот может явиться самодостаточным фактором, приводящим к формированию аномальных белков и развитию конформационных болезней мозга.

В табл. 1 приведены основные D-аминокислоты, найденные в тканях и жидкостях человека и животных в норме, при старении и патологии ЦНС.

Клиническое применение D-аминокислот и ферментов, участвующих в их метаболизме

Высокочувствительные методы определения D-аминокислот и их ферментов в биологических образцах могут быть использованы для ранней диагностики и мониторинга ряда заболеваний, в том числе нейродегенеративной, иммунной и онкологической природы [29, 52, 53, 68, 91, 101, 112, 140, 142, 166, 167, 173, 178].

Весьма перспективны поиски соединений, увеличивающих концентрации D-серина в тканях мозга, которые тем самым обеспечивали бы лечение шизофрении путем стимуляции NMDA-рецепторов [17]. Другим разрабатываемым подходом является повышение эффективности функционирования NMDA-рецепторов за счет перорального или инъекционного введения D-серина дополнительно к антипсихотической терапии [81, 135, 180]. Для реализации первого подхода предложена методика высокоэффективного скрининга активности DAAO в клетках для автоматизированного поиска ингибиторов данного фермента: в результате было отобрано 1966 потенциальных ингибиторов для дальнейших исследований. В качестве лекарственного средства предложено использовать, в частности, 5-метилпиразол-3-карбоновую кислоту [27]. Результаты тестирования у крыс показали, что разовая инъекция ингибитора DAAO приводит к значительному увеличению содержания D-серина в полушарной коре и среднем мозге, причем непрерывное введение препарата в течение 4 нед не вызывало побочных эффектов. Назначение D-серина совместно с нейролептиками уменьшает выраженность позитивных, негативных и когнитивных симптомов при шизофрении [85, 93, 180]. В настоящее время проводятся клинические испытания препаратов на основе D-серина у пациентов с шизофренией.

При изучении NMDA-токсичности на клеточной модели БАС было показано, что добавление D-серина в культуру

спинальных мотонейронов усиливает NMDA-токсичность. При добавлении в культуру ингибитора серин-рацемазы — феназинметосульфата [104] установлено, что данное соединение по мере угнетения активности серин-рацемазы снижает проявления NMDA-токсичности у мышей с моделью БАС.

Полученные результаты позволили начать поиск специфических лекарственных препаратов на основе DAAO, направленных на связывание D-серина и предотвращение феномена глутаматной эксайтотоксичности. Был синтезирован фермент дезаминаза D-серина, который обладает высоким сродством и специфичностью к D-серину и эффективно разрушает его в культуре клеток [98]. На срезах гиппокампа определено, что снижение уровня эндогенного D-серина фактически нивелирует NMDA-зависимую нейротоксичность. Это показывает, что именно D-серин, а не глицин, является главным ко-агонистом NMDA-рецепторов при гибели нейронов в гиппокампе. Показано значение D-серина в модуляции активности NMDA-рецепторов и в других отделах мозга — супраоптическом ядре гипоталамуса [148], сетчатке, коре мозга [99].

Общеизвестно, что чрезмерная активация глутаматом NMDA-рецепторов и, соответственно, избыточный вход кальция в клетку играет важную роль не только при хронических (нейродегенеративных и др.), но и при острых заболеваниях нервной системы [33, 46]. Так, блокада NMDA-рецепторов имеет нейропротективный эффект на модели инсульта у животных, но не всегда полностью воспроизводится в клинических исследованиях [118, 150]. С этой позиции селективные ингибиторы серин-рацемазы рассматриваются как новая стратегия защиты от повреждения нейронов при нарушении мозгового кровообращения и гибели клеток при нейродегенеративных заболеваниях.

Разработка методов лечения, основанных на контроле уровня соответствующих D-аминокислот в клетках определенных тканей путем изменения активности DAAO, является сложной задачей, поскольку фермент DAAO одновременно участвует в регуляции совершенно разных процессов. Выходом из этой ситуации может быть использование тканеспецифичной генотерапии [15] и наноконструкций [190], видоизменяющих профиль субстратной специфичности. В этом случае при неизменном уровне биосинтеза фермента можно будет селективно влиять на уровень только одной определенной D-аминокислоты. Реализация такого подхода является задачей ближайшего будущего.

Список литературы см. на сайте журнала www.annaly-nevrologii.ru

D-amino acids in the pathogenesis of neurodegenerative diseases and in normal ageing

A.V. Chervyakov, M.N. Zaharova, N.B. Pestov

*Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences;
Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences (Moscow)*

Keywords: D-amino acids, NMDA receptors, neurodegenerative diseases, aging.

Recent studies have shown that D-amino acids (DAA) are widely represented in tissues of higher organisms, including man. Specific functions of particular DAA in a healthy body are determined: for instance, D-serine plays an important role in neuroplasticity, memory and learning, while D-aspartate is involved in the development processes and endocrine functions. Pathogenicity of DAA is associated with over-activation of NMDA glutamate receptors, conformational changes of normal protein molecules upon incorporation in the polypeptide chain, and increase in concentration of reactive oxygen species during

oxidase metabolism of DAA. Assessment of the levels of DAA in biological fluids, as well as detection of enzyme activity and mutations of the respective genes may serve as diagnostic markers in a number of the diseases of the central nervous system (Alzheimer's disease, Parkinson's disease, amyotrophic lateral sclerosis, etc). Practical interest to the content and the functions of DAA is also related to perspectives of elaborating novel therapeutic strategies aimed at correcting the synthesis/degradation of DAA and modulation of activity of their receptors.

Контактный адрес: Червяков Александр Владимирович – канд. мед. наук, науч. сотр. отд. нейрореабилитации ФГБУ «НЦН» РАМН. 125367 Москва, Волоколамское ш., д. 80. E-mail: tchervyakovav@gmail.com;

Захарова М.Н. – вед. науч. сотр. VI неврол. отд. ФГБУ «НЦН» РАМН;

Пестов Н.Б. – старш. науч. сотр. группы кросс-сшивающих ферментов ИБХ РАН.