

Нейропротекторное действие миоинозитола на клеточной модели глутаматного стресса как основа для профилактики нарушений внутриутробного развития головного мозга

Калачева А.Г.¹, Торшин И.Ю.², Стельмашук Е.В.³, Генрихс Е.Е.³,
Александрова О.П.³, Хаспеков Л.Г.³, Громова О.А.^{1,2}

- ¹ – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иваново
² – Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» Российской академии наук», Москва
³ – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии», Москва

Резюме. Миоинозитол – основа для синтеза важной группы сигнальных молекул, инозитолфосфатов, которые опосредуют передачу сигнала от рецепторов ростовых факторов и нейротрансмиттеров. Дотации миоинозитола способствуют профилактике фолат-резистентных пороков развития и нейропротекции мозга плода в условиях ишемии. В работе представлены результаты исследования эффектов миоинозитола на рост нейронов мозжечка в культуре в условиях глутаматного стресса. Показано, что эффекты миоинозитола на выживание нейронов (+17 %) превосходят эффекты средств, которые обычно используются для нейропротекции (пептидные экстракты – +10 %, холиновые препараты – не более 3 %). Подтверждённое в настоящей работе прямое нейропротекторное действие миоинозитола указывает на важность использования миоинозитола во время беременности с целью нейропротекции мозга плода.

Ключевые слова: нейробиология; нейропротекция; нейротрофичность; нейропластичность; развитие мозга плода; цитидин-5-дифосфохолин; церебролизин; миоинозитол

Neuroprotective effect of myoinositol on the cellular model of glutamate stress as a basis for the prevention of disorders of intrauterine development of the brain

Kalacheva A.G.¹, Torshin Y.U.², Stelmashuk E.V.³, Haspekov L.G.³, Gromova O.A.^{1,2}

- ¹ – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Ivanovo State Medical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ivanovo
² – Federal Research Center «Computer Science and Control» of the Russian Academy of Sciences, Moscow
³ – Research Center of Neurology, Moscow

Abstract. Myoinositol is the basis for the synthesis of an important group of signal molecules, inositolphosphates, which mediate signal transmission from receptors of growth factors and neurotransmitters. Grants myo-Inositol promote the prevention of folate-resistant defects and neuroprotection of the fetal brain ischemia. The paper presents the results of a study of the effects of myoinositol on the growth of cerebellar neurons in culture under glutamate stress. It is shown that the effects of myoinositol on the survival of neurons (+17 %) exceed the effects of drugs that are usually used for neuroprotection (peptide extracts – + 10%, choline preparations – no more than 3 %). Confirmed in the present work, a direct neuroprotective effect of myo-Inositol indicates the importance of the use of myo-Inositol during pregnancy with the aim of neuroprotection of the fetal brain.

Keywords: neurocytology; neuroprotection; neurotrophines; neuroplasticity; brain development of the fetus; cytidine-5-diphosphocholine; Cerebrolysin; myoinositol

Введение

Нейропротекция мозга плода чрезвычайно важна на всех стадиях беременности. На ранних сроках беременности нейропротекция необходима для профилактики врождённых пороков развития мозга (ВПРМ); в течение всей беременности (особенно в последнем триместре) – для профилактики ишемии головного мозга плода.

Аномалии развития ЦНС плода возникают вследствие нарушений процессов размножения, миграции, дифференциации и программированной гибели клеток во время

роста эмбриона. Важным фактором формирования ВПРМ является сахарный диабет, осложняющий течение беременности не менее, чем у 2,4 % беременных [1]. Профилактика ВПРМ фолатами не эффективна в случае т. н. «фолат-резистентных» пороков развития, так как фолаты далеко не единственный микронутриент, необходимый для развития ЦНС плода.

Одним из важнейших нейроактивных микронутриентов, который принимает комплексное участие в эмбриогенезе и развитии мозга плода, является миоинозитол (витамин В8), специфическая разновидность шестиатомных спиртов – инозитолов. Инозитолы (циклогексан-1,2,3,4,5,6-гексолы) представлены девятью стереоизомерами, из которых именно миоинозитол (рис. 1) имеет принципиальное значение для функционирования всех типов клеток. Миоинозитол и его фосфатные производные (инозитолфосфаты, фосфатидилинозитоловые липиды) выступали в качестве важных передатчиков сигнала во внутриклеточных сигнальных каскадах.

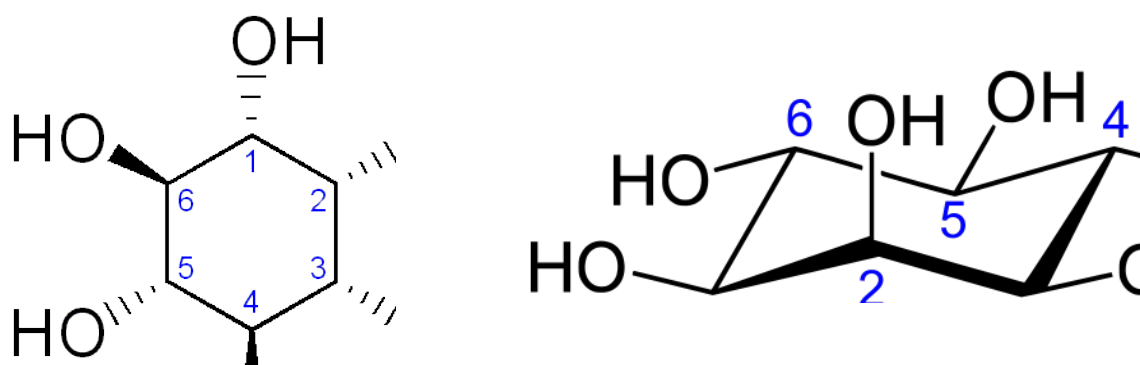


Рис. 1. Химическая структура миоинозитола (цис-1,2,3,5-транс-4,6-циклогексангексол)

Примечания: Сплошные треугольные стрелки обозначали связи, направленные из условной плоскости рисунка к читателю и соответствуют приставке «цис-» в полном названии молекулы, штрих-пунктирные из плоскости рисунка от читателя («транс-» в полном названии молекулы).

В реферируемых научных журналах представлено более 40 000 публикаций о молекулярно-физиологических механизмах действия миоинозитола, включающих также и результаты клинических исследований. В работе [2] представлены результаты анализа всего этого массива публикаций по миоинозитолу, проведённого посредством современных методов интеллектуального анализа данных. Показано, что производные миоинозитола участвуют в передаче сигналов от рецепторов ростовых факторов, рецептора инсулина [3], расщеплении жиров и снижении уровня холестерина в крови [4], модуляции активности нейротрансмиттеров [5] и др.

Анализ 120 миоинозитол-зависимых белков протеома человека показал, что более половины из этих белков вовлечены в поддержку жизнедеятельности сердечно-сосудистой системы, иммунитета и структуры соединительной ткани (включая эффекты на поддержание состояния костей, хряща, кожи и процессы заживления ран). Не менее важно участие миоинозитола в метаболизме сахаров (прежде всего, сигнальном каскаде инсулина) и в поддержании функционирования ЦНС (включая нейротрофические и нейропротекторные роли, рис. 2) [2].

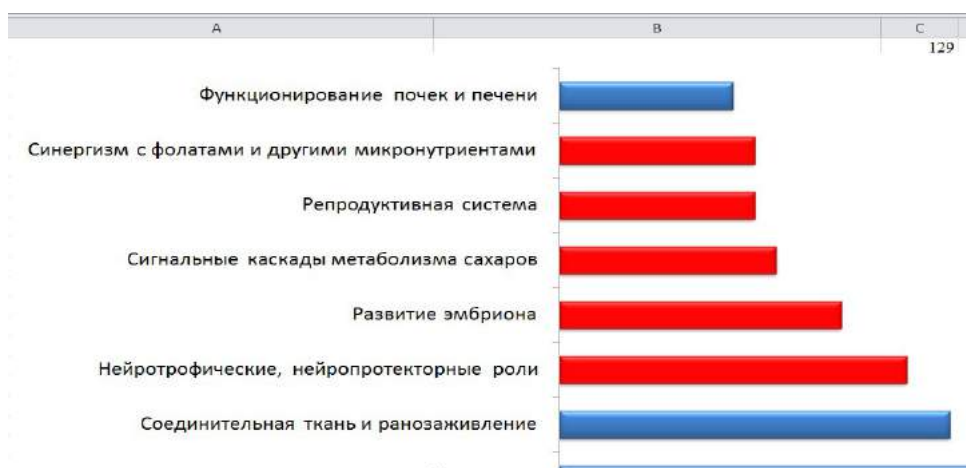


Рис. 2. Результаты анализа биологических и физиологических ролей белков, участвующих во внутриклеточной передаче сигнала посредством производных миоинозитола

Примечания: Приведены числа белков в каждой из категорий. Красным цветом выделены группы белков, поддержание активности которых принципиально важно для профилактики ВПРМ.

Аномалии метаболизма миоинозитола ассоциированы с когнитивными нарушениями [6], депрессией [7], диабетической нейропатией [8] и др. Фундаментальные и клинические исследования показали, что миоинозитол необходим для поддержки нейрональной функции, включая синаптическую передачу и осуществление физиологических эффектов таких нейротрансмиттеров как *серотонин, дофамин, ГАМК, нейромедин*. Миоинозитол необходим для *нейрогенеза (нейротрофический эффект), нейропротекции* (в т. ч. защиты клеток сетчатки глаза), осуществления процессов зрения, слуха, вкуса и долговременной потенциации в гиппокампе (поддержка памяти).

Столь широкий спектр биологических активностей миоинозитола позволяет предположить, что миоинозитол может проявлять и более специфические воздействия на сигнальные каскады выживания нейронов в условиях стресса (гипоксия, нейротоксичность глутамата, энергетический дефицит и гипогликемия, дисфункция митохондрий избыточное воспаление и др.). В настоящей работе проведена валидация нейропротекторных эффектов миоинозитола методами нейробиологии, изучающими действие веществ непосредственно на нейроны [9–11].

Нейробиологические исследования позволяют установить прямые нейропротекторные эффекты препаратов при разных стрессорных воздействиях. Например, при ишемии головного мозга таковыми являются энергетический дефицит, нейротоксичность глутамата, оксидативный стресс, дисфункция митохондрий, метаболический ацидоз [12]. Нейробиологические исследования позволяют демонстрировать влияние препаратов на конкретные факторы стресса и доказывать непосредственное действие исследуемого препарата именно на выживание нейронов (а не на другие типы клеток) [13, 14].

В настоящей работе представлены результаты экспериментальной валидации прямого нейропротекторного действия миоинозитола (в синергидной комбинации с фолиевой кислотой, препарат Фертина, 1 пакетик-саше содержит порошок растворимый Инозит 1000 мг и Фолиевую кислоту 100 мкг, пр-во Орион Фарма, рег. №: RU.77.99.88.003.E.002116.05.18 от 25.05.18). Исследования проводились на зернистых нейронах мозжечка новорождённых крыс, выращиваемых в культуре в условиях глутаматного стресса. Эти исследования предоставили уникальную возможность продемонстрировать прямое нейропротекторное действие миоинозитола на нейроны мозга плода. Во-первых, воспроизведение глутаматного стресса физиологически

адекватно моделирует условия умеренной ишемии мозга, возникающей при внутриутробном развитии плода. Во-вторых, изучение воздействия миоинозитола непосредственно на нейроны, без прохождения через центральное кровообращение, печень и другие системы организма, позволяет доказать, что именно миоинозитол (а не какие-то другие изменения в организме, вызываемые приёмом препарата) проявляет нейропротекторное действие.

Материалы и методы

В работе использовались 7-8-суточные культуры, полученные методом ферментно-механической диссоциации клеток мозжечка 7-дневных крыс по общепринятой методике. Крысы, подвергались летальной дозе эфирного наркоза, после чего 5 минут стерилизовались 70 % спиртом. Далее, производилось извлечение мозжечка и перенесение его в пластиковую чашку Петри, заполненную фосфатным буфером, лишенным ионов кальция и магния. Фрагменты ткани инкубировали 15 мин при 37°C в фосфатном буфере, содержащем 0,05 % трипсина, 0,02 % ЭДТА и 0,8 % глюкозы. После инкубации ткань промывали в двух сменах фосфатного буфера и один раз средой культивирования, далее подвергали механической диссоциации в питательной среде для культивирования. В состав питательной среды входит 90 % минимальной среды «Игла», 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамин, 5 мМ KCl и 10 мМ буфера HEPES, pH 7,2–7,4. Суспензию клеток центрифугировали 1 мин при 1000 об/мин, супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в питательной среде.

Культивирование нейронов производили в 96-луночных пластиковых планшетах, покрытых полиэтиленгликолем или полилизинем (25 мМ хлорида калия). В каждую ячейку планшета добавляли по 0,1 мл суспензии клеток. Культивирование производили 7–8 суток в CO₂-инкубаторе, заполненном газовой смесью (95 % воздуха +5 % CO₂), при температуре 35,5°C и относительной влажности 98 %. К этому сроку культивированные зернистые нейроны (КЗН) достигали своей морфологической и нейрохимической зрелости. Состояние культур контролировали ежедневно и на каждом этапе эксперимента путём визуального просмотра в инвертированном микроскопе при фазовом контрасте. Вещества добавляли в среду культивирования на 2 сутки *in vitro* на весь срок культивирования (до 7 суток). Исходя из концентрации вещества в пробирке (10 мМ), его минимально возможное разведение для добавления к культурам 1:10, чтобы сохранить необходимые свойства питательной среды, т. е. 1 мМ. 96-луночные пластиковые планшеты дали возможность тестировать сразу 4 различные концентрации образцов. Были выбраны следующие концентрации: 0,1; 0,2; 0,5; 1 мМ.

Количественную оценку выживаемости клеток производили с помощью прямого подсчёта живых нейронов. Клетки-зерна легко идентифицировать прижизненно как небольшие, 7-10 мкм в диаметре, округлые или овальные нейроны. При окраске фиксированных культур трипановым синим хорошо видны ядра КЗН, занимающие большую часть тел нейронов и окруженные тонким ободком цитоплазмы (рис. 3).

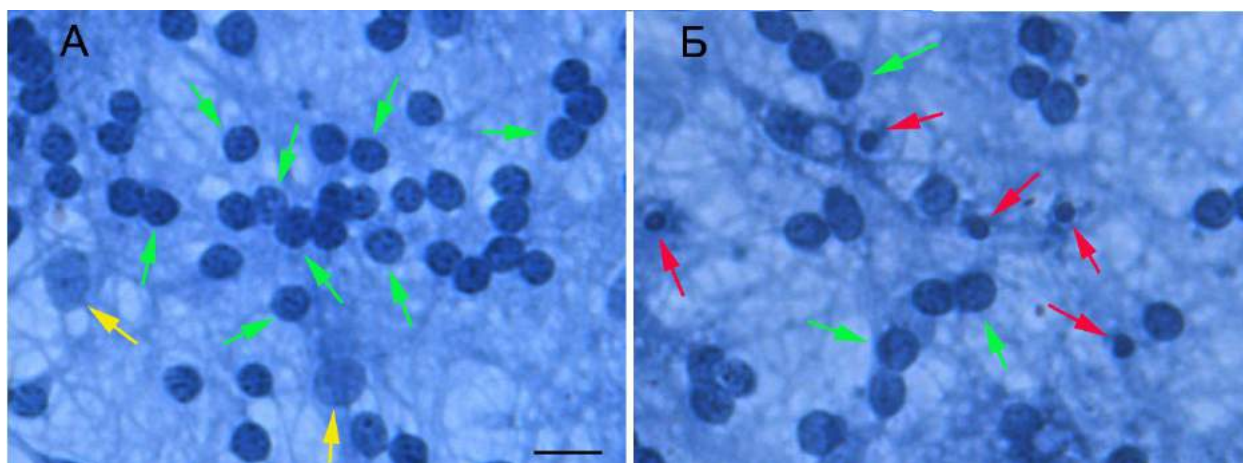


Рис. 3. Первичная диссоциированная фиксированная культура клеток мозжечка, окрашенная трипановым синим. А – контроль, Б – обработка 24 часа глутаматом (L-Glutamic acid monosodium salt 99–100 %, Sigma, USA, N.G-1626)

Примечания: Зелёные стрелки указывали на зернистые нейроны с нормальной морфологией, жёлтые на ядра глиальных клеток, красные показывали пикнотические ядра погибших нейронов. Масштаб 15 мкм.

Для каждого вещества было выполнено как минимум 3 эксперимента, при этом на каждую точку брали по 3 культуры, в каждой из которых фотографировали и просчитывали по 5 последовательных полей зрения (как минимум 45 полей зрения из 9-ти культур 3-х независимых экспериментов). Количество нейронов с неизменной морфологией в контрольных культурах принимали за 100 % выживаемости. Для статистического анализа использовали тест ANOVA с поправками Бонферони и Даннета. Отличия между группами считали достоверными при $p < 0,05$. Результаты выражали как среднее $\pm$ SEM.

Результаты и обсуждение

Предварительное моделирование повреждения культур нейронов глутаматом показало, что глутамат оказывал дозозависимый токсический эффект на выживание нейронов (Рис. 4). Выбор концентрации глутамата в каждом опыте осуществлялся таким образом, чтобы выживаемость КЗН составляла 30–80 % от интактного контроля (что соответствует умеренному глутаматному стрессу). При выживаемости нейронов менее 30% (сильный глутаматный стресс) или более 80 % (слабый глутаматный стресс) нейропротекторные эффекты веществ гораздо менее наглядны.

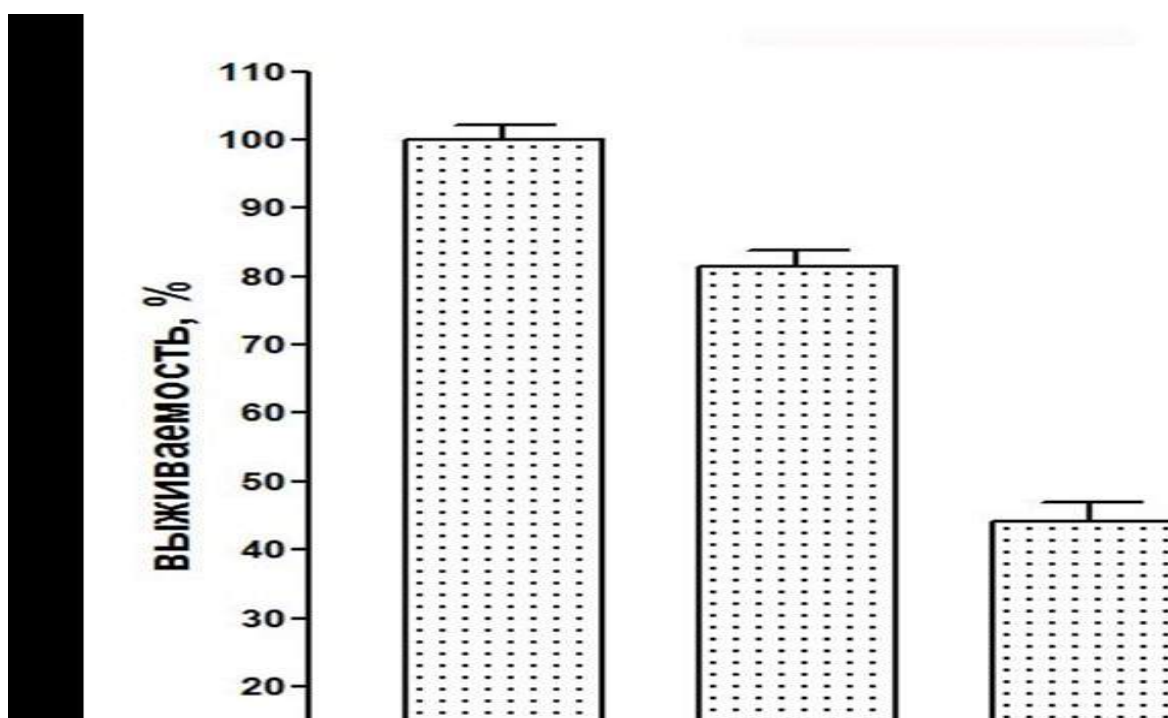


Рис. 4. Влияние глутамата на выживаемость культур (подсчёт морфологически неизмененных нейронов на фиксированных окрашенных трипановым синим препаратах)

Известно, что нейропротекторные свойства различных препаратов выявляются, как правило, при достаточно длительном применении. Поэтому, при исследовании нейропротекторных свойств миоинозитола и других нейропротекторных средств мы пользовались отработанной нами ранее «профилактической» схемой эксперимента: вещество вносится в среду культивирования на 2-ые сутки и оставляется до 7-ых суток эксперимента. Затем, проводится обработка клеток глутаматом и осуществляется подсчёт числа выживших нейронов [9].

Нейроцитологические эксперименты были проведены для миоинозитола (действующее вещество препарата Фертина, производства ОрионФарма) и таких нейропротекторных средств, как экстракт пептидов мозга свиньи (церебролизин), цитидин-5-дифосфохолин (цитиколин), цитидин-5-дифосфохолинат лития. В ходе исследования было использовано 1 920 культур и произведены подсчёты более чем для 200 тыс. нейронов.

Миоинозитол не проявлял токсических эффектов и не влиял на выживаемость КЗН в контроле, т. е. в «холостом» эксперименте (т. е. без добавления глутамата, рис. 5). При воздействии глутамата миоинозитол в концентрации 0,2–0,5 мМ достоверно повышал выживаемость нейронов на 12...17 % (0,2 мМ миоинозитола – $54,9 \pm 2,6$ %; 0,5 мМ миоинозитола – $59,1 \pm 2,9$ %, контроль – $42,6 \pm 2,2$ %, рис. 5). Примеры изображений обсчитанных культур нейронов приведены на Рис. 6.

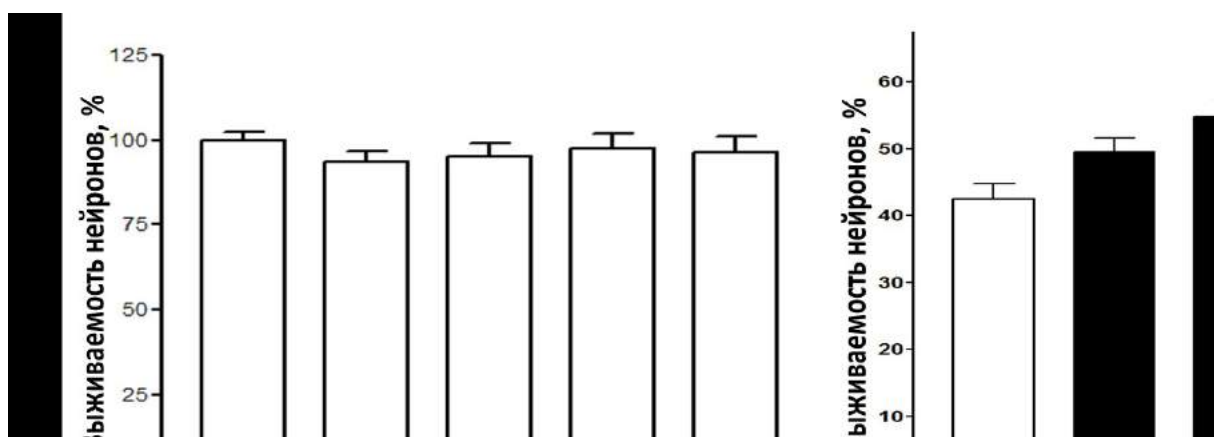


Рис. 5. Результаты нейроцитологических исследований препарата Фертина (миоинозитол)
Примечания: Белые столбики – результаты «холостого эксперимента» (в отсутствие глутамата), чёрные – действие миоинозитола в условиях глутаматной токсичности (100мкМ). ** – $p < 0,01$ по сравнению с действием глутамата без добавления вещества. Количество просчитанных полей зрения – 36–45.

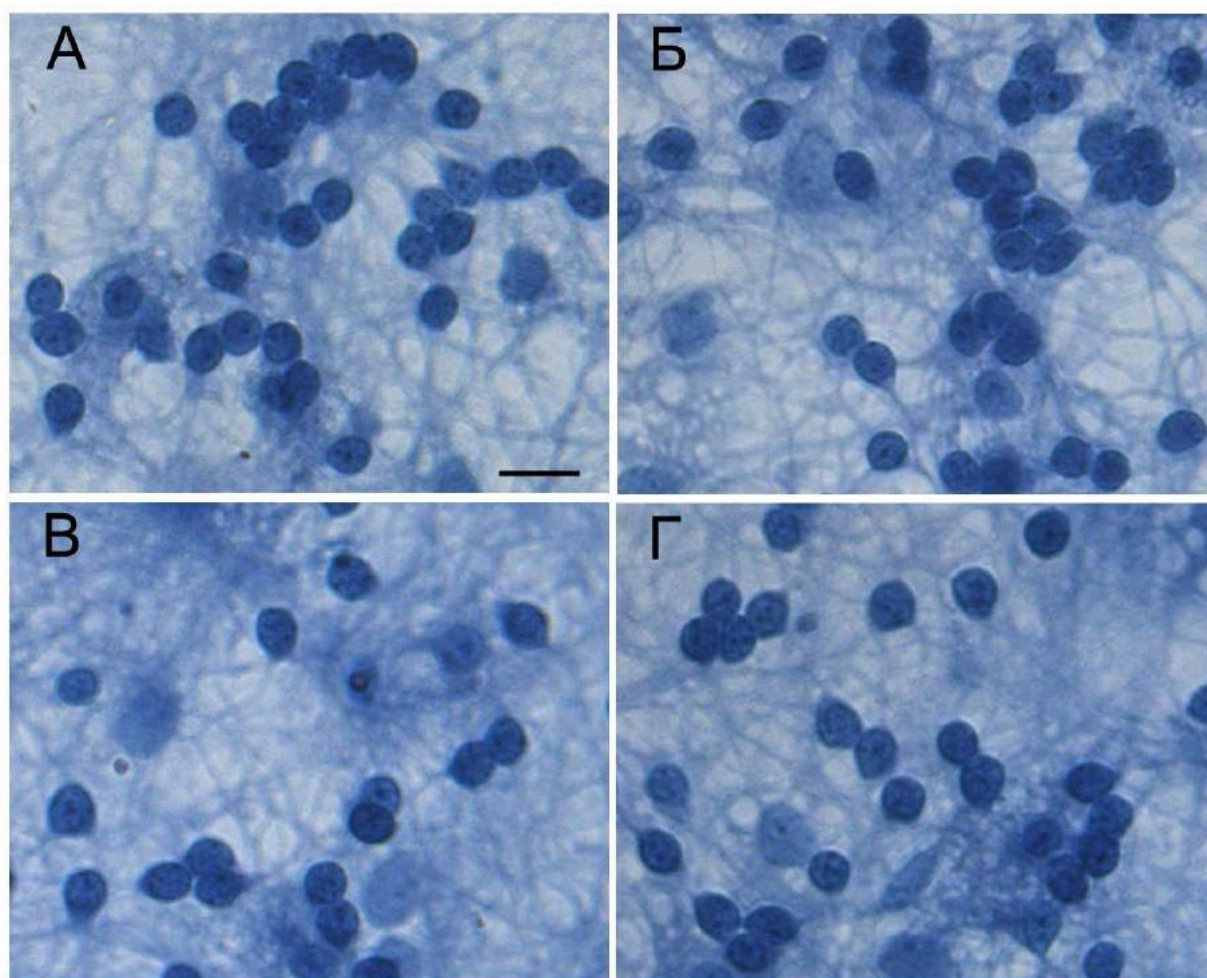


Рис. 6. Действие миоинозитола на выживаемость КЗН при глутаматной токсичности: А – контроль; Б – №3 (0,5 мМ); В – глутамат (100мкМ); Г – №3 (0,5 мМ) на фоне глутамата (100мкМ)

Примечания: Фиксированные культуры, окрашенные трипановым синим. Масштаб – 15 мкм.

Нейроцитологические исследования других средств показали гораздо менее выраженные нейропротекторные свойства. Например, в случае пептидного экстракта поросят до 6 мес. (церебролизин) был выявлен слабый, но достоверный нейропротекторный эффект – увеличение выживаемости на 5...8 % (общая выживаемость при концентрации пептидного экстракта, равной 0,1 мМ – 53 ± 3 %, при концентрации 0,2 мМ – 52 ± 3 %, контроль – 45 ± 2 %, $p < 0,05$). Более того, при концентрации пептидного экстракта, равной 1,0 мМ был выявлен слабый токсический эффект – выживало всего $36,3 \pm 2,6$ % нейронов (рис. 7). Примеры фотографий культур из просчитанных полей зрения приведены на рис. 8.

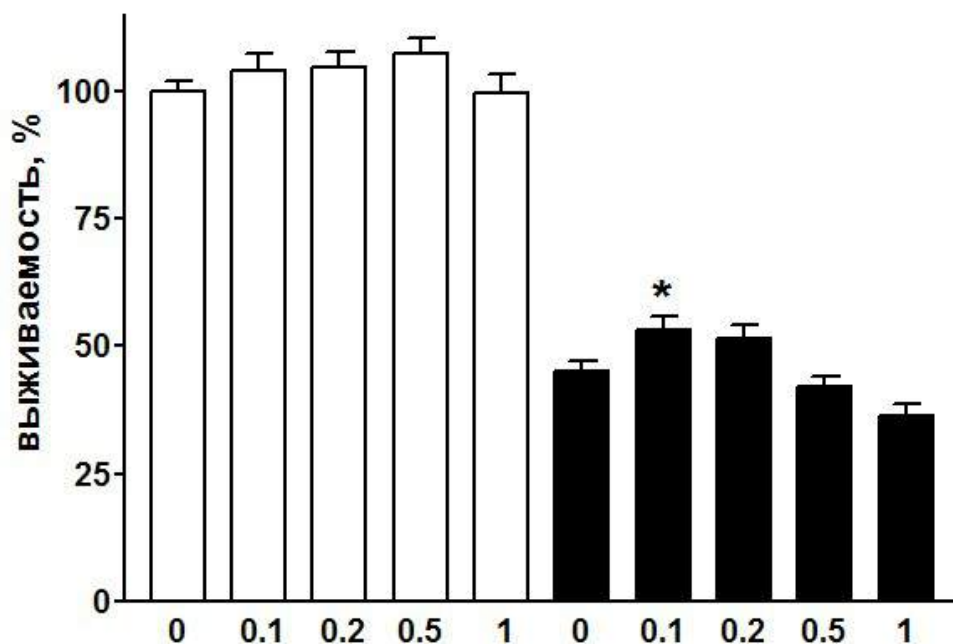


Рис. 7. Действие пептидного экстракта церебролизина на выживаемость культивированных зернистых нейронов мозжечка крыс в условиях глутаматного стресса

Примечания: Белые столбики – результаты «холостого эксперимента» (в отсутствие глутамата), чёрные – на фоне 100мкМ глутамата в среде культивирования. По оси абсцисс показана концентрация пептидного экстракта в мМ, ординат – выживаемость КЗН в процентах от контроля (первый белый столбец). * – $p < 0,05$ по сравнению с действием глутамата без добавок.

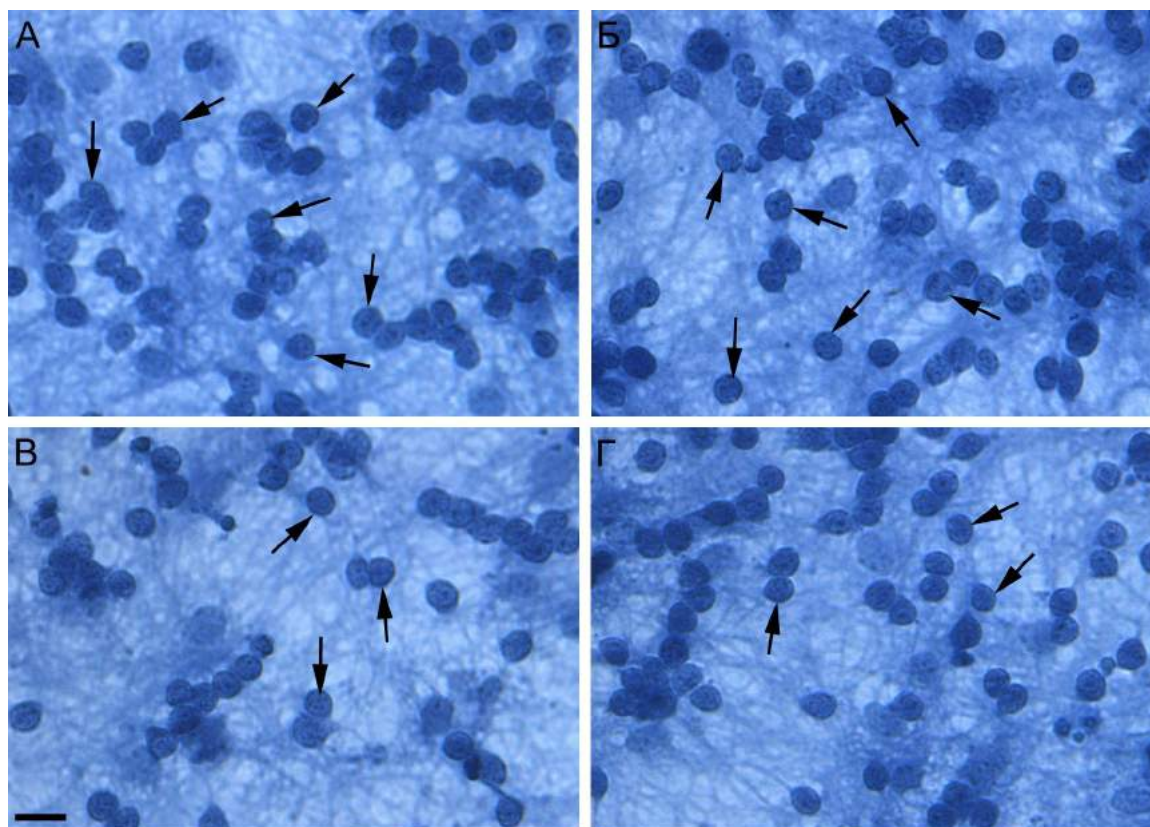


Рис. 8. Культивированные зернистые нейроны мозжечка крыс при действии глутамата и пептидного экстракта. А – контроль, Б – пептидный экстракт 0,1мМ, В – глутамат 100 мкМ, Г – совместно глутамат и пептидный экстракт.

Примечания: Фиксированные культуры, окрашенные трипановым синим. Стрелками указаны интактные КЗН. Масштабный отрезок 15 мкМ.

В случае других исследованных нейропротекторных средств непосредственный нейропротекторный эффект на выживание нейронов практически отсутствовал. Например, при воздействии цитидин-5-дифосфохолина выживаемость в контроле при действии глутамата составила $59,3 \pm 3,0$ %, а при добавлении цитидин-5-дифосфохолина – не превышала 65% (0,1 мМ – $63,6 \pm 3,6$ %, нет достоверных различий, $p > 0,05$). При этом, более высокая концентрация цитидин-5-дифосфохолина, 1 мМ, несколько уменьшала выживаемость КЗН ($43,6 \pm 2,4$ %, Рис. 9, 10). Схожая ситуация наблюдалась и при использовании потенциального нейропротектора – цитидин-5-дифосфохолината лития (Рис. 11, 12).

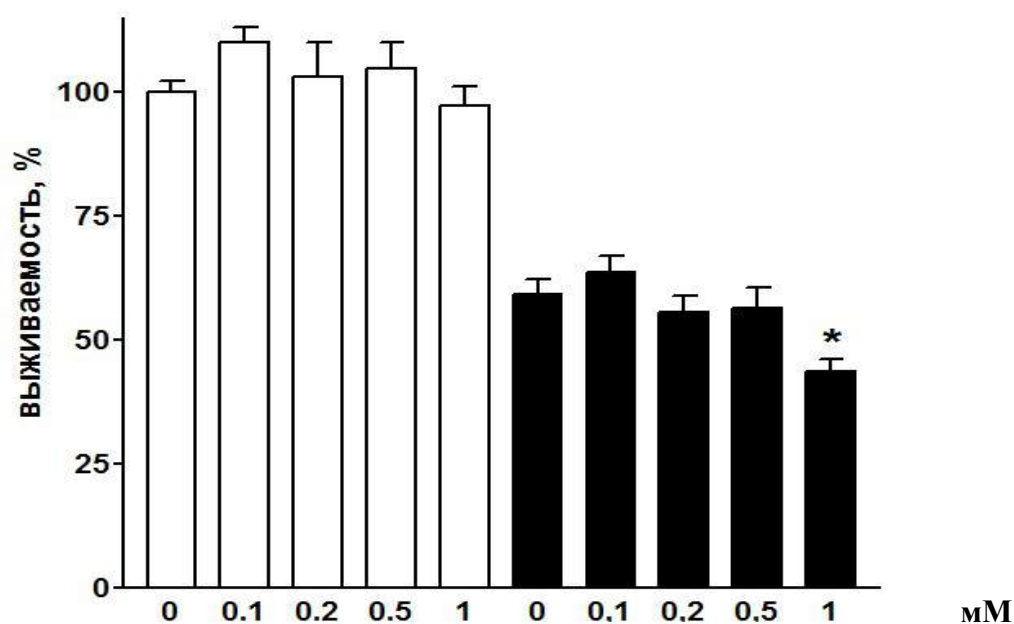


Рис. 9. Действие глутамата и цитидин5-дифосфохолина на выживаемость культивированных зернистых нейронов мозжечка крыс

Примечания: Белые столбики в отсутствие глутамата, чёрные на фоне 100 мкМ глутамата в среде культивирования. По оси абсцисс показана концентрация цитидин 5-дифосфохолина в мМ, ординат – выживаемость КЗН в процентах от контроля (первый белый столбец). * – $p < 0,05$ по сравнению с действием глутамата без добавок.

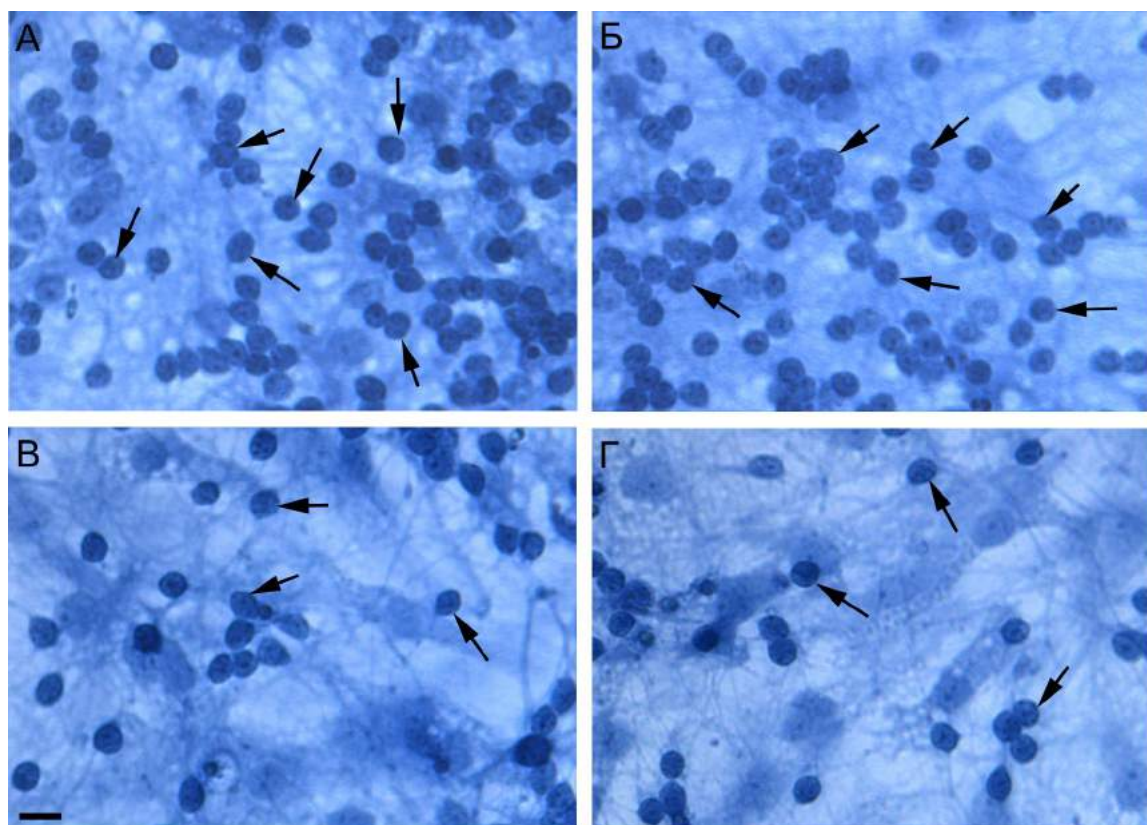


Рис. 10. Культивированные зернистые нейроны мозжечка крыс при действии глутамата и цитидин-5-дифосфохолина. А – контроль, Б – цитидин-5-дифосфохолин, 1 мМ, В – глутамат 100 мкМ, Г – совместно глутамат и цитидин-5-дифосфохолин

Примечания: Фиксированные культуры, окрашенные трипановым синим. Стрелками указаны интактные КЗН. Масштабный отрезок 15 мкм.

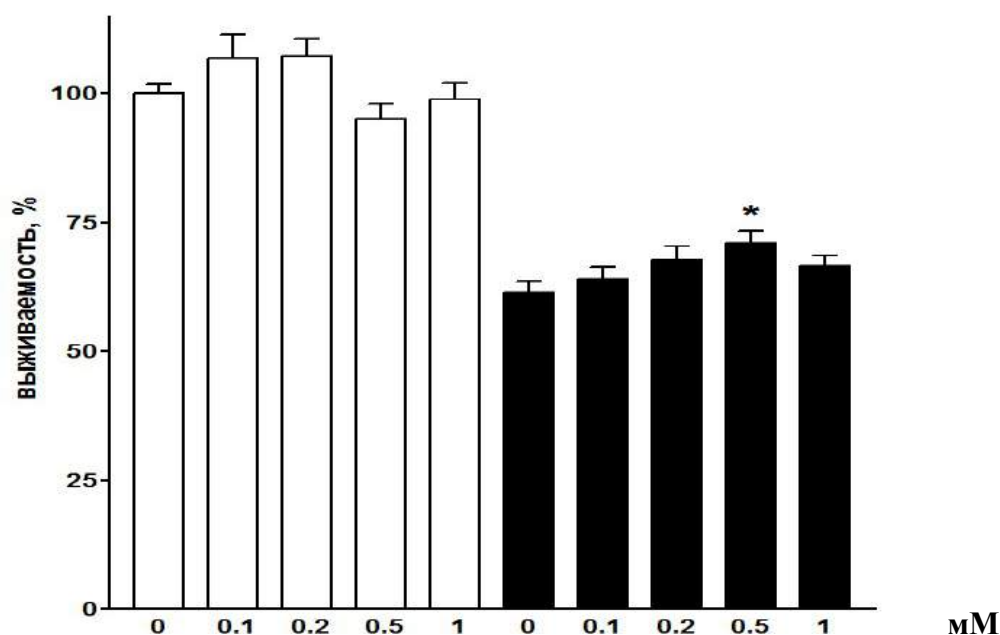


Рис. 11. Действие глутамата и цитидин-5-дифосфохолината лития на выживаемость культивированных зернистых нейронов мозжечка крыс

Примечания: Белые столбики в отсутствие глутамата, чёрные на фоне 100 мкМ глутамата в среде культивирования. По оси абсцисс показана концентрация цитидин-5-дифосфохолината лития в мМ, ординат – выживаемость КЗН в процентах от контроля (первый белый столбец). * – $p < 0,05$ по сравнению с действием глутамата без добавок.

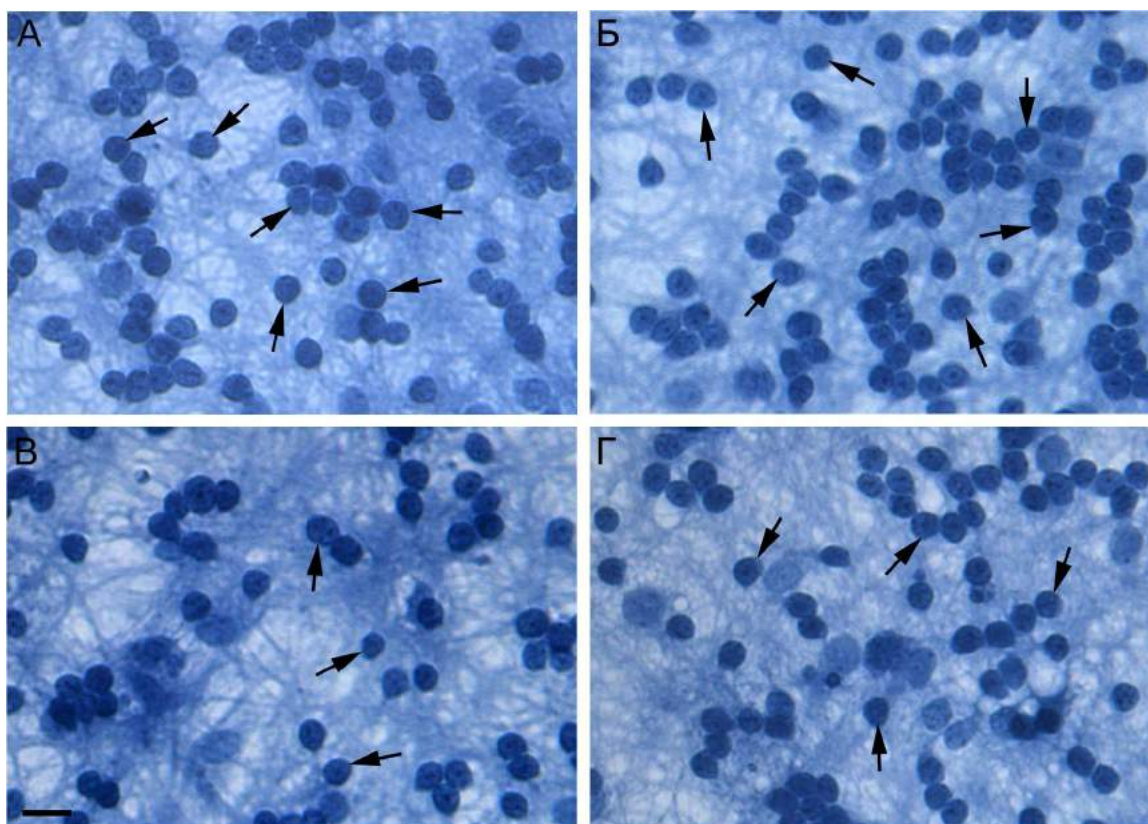


Рис. 12. Культивированные зернистые нейроны мозжечка крыс при действии глутамата и цитидин5-дифосфохолината лития. А – контроль, Б – цитидин5-дифосфохолината лития 0,5 *мМ, В – глутамат 100 мкМ, Г – совместно глутамат и цитидин5-дифосфохолината лития

Примечания: Фиксированные культуры, окрашенные трипановым синим. Стрелками указаны интактные КЗН. Масштабный отрезок 15 мкм.

Обсуждение результатов

Результаты проведённого нейроцитологического исследования весьма важны как с точки зрения оценки нейропротекторных эффектов миоинозитола, так и с точки зрения эффектов «признанных» нейропротекторов. Как было отмечено выше, нейроцитологические исследования уникальны в том смысле, что позволяют подтвердить прямое нейропротекторное действие изучаемых веществ непосредственно на растущие нейроны плода. В то же время, действие других нейропротекторов может быть опосредованным: фосфохолин, например, может оказывать нейропротекторное действие через поддержку функции печени [15].

В результате проведения настоящей серии экспериментов было показано, что «профилактическое» применение действующего вещества препарата Фертина – миоинозитола (за 5 сут. до создания глутаматного стресса), достоверно и существенно (в среднем, на 12...17 %, $p=0,01$) повышает выживаемость нейронов в культуре. Создание глутаматного стресса в культуре нейронов моделирует ишемию мозга плода, особенно при патологических родах. Обогащение клеточной среды миоинозитолом до создания глутаматного стресса соответствует профилактическим дотациям миоинозитола во время беременности. Поэтому, полученные результаты нейроцитологического исследования имеют существенное значение для антиишемической защиты мозга плода и в ранние, и в поздние сроки беременности.

Ишемический стресс, переносимый эмбрионом в ранние сроки беременности, стимулирует формирование врождённых пороков развития мозга. ВПРМ возникают под действием разнообразных факторов тератогенеза, к которым относятся алкоголь, инфекционные заболевания, передающиеся от матери плоду, ионизирующее излучение, фармацевтические препараты, никотин сигаретного дыма и др. Формирование ВПРМ также является следствием дисбаланса (как правило, недостатка) ростовых факторов, необходимых для роста эмбриона: витамина А, фолатов (витамин В9) и синергидных с ними пиридоксина (витамин В6), цинка, миоинозитола (витамин В8) и других эссенциальных микронутриентов [16].

Большинство ВПРМ (в т. ч. дефекты нервной трубки, ДНТ, расщелины нёба) являются фолат-чувствительными (более 70 %) и их возникновение может профилактироваться дотациями фолатов (предпочтительно, в составе витаминно-минеральных комплексов) в ранние сроки беременности. В то же время, формирование ВПРМ у пациенток вопреки дотациям фолатов указывает на существование т. н. «фолат-резистентных» ВПРМ (30 %). Риск фолат-резистентных ВПРМ может быть существенно снижен при приёме препаратов миоинозитола [17], поддерживающего эмбриогенез и развитие плода [18].

Установленный нами непосредственный нейропротекторный эффект миоинозитола является важной составляющей эмбриопротекторного действия миоинозитола. В частности, трудно переоценить роль миоинозитола в профилактике ВПР, связанных с инсулинорезистентностью: ведь производные миоинозитола участвуют в процессах передачи сигнала от инсулинового рецептора [19]. Истощение миоинозитола в эмбриональной ткани на этапе органогенеза играет, по всей видимости, важную роль в индуцировании эмбриопатий, вызываемых гипергликемией. В эксперименте с моделями

стрептозоцинового диабета содержание миоинозитола в эмбрионах было снижено на 36 % ($p=0,01$) по сравнению с контролем и было ассоциировано с задержкой развития (длина эмбриона $3,37 \pm 0,04$ мм, контроль – $3,87 \pm 0,03$ мм, $p=0,01$; число сомитов – $27,5 \pm 0,2$, контроль – $29,1 \pm 0,2$, $p=0,01$) и значительно повышенной частотой нейронных повреждений (17,6%, контроль – 1,9 %, $p<0,001$) [20].

Миоинозитол способствует снижению инсулинрезистентности и, одновременно, весьма важен для преодоления негативного воздействия повышенных уровней глюкозы на нейроны. В эксперименте, приём миоинозитола приводил к значительному снижению частоты развития ДНТ в модели стрептозоцинового диабета (9,5%, контроль – 20,4 %, $p<0,05$) [21].

Анализ фолат-чувствительных и фолат-резистентных моделей ДНТ [22] в экспериментах по делеции генов позволил установить более 60 генов, инактивация которых приводит к линиям мышей с ДНТ [23]. Не менее 22 из этих 60 генов кодируют белки и ферменты, активность или уровни которых существенно зависят от наличия определённых микронутриентных кофакторов (табл. 1).

Таблица 1

Гены, мутации которых приводят к ДНТ в эксперименте, а соответствующие белки нуждаются в соответствующих микронутриентных кофакторах (МНК)

Ген	МНК	Функция
Abl, Arg	Mg	Рост и выживание клеток, реконструкция активного цитоскелета в ответ на повреждение ДНК, апоптоз и ряд внеклеточных сигналов
Axd	-	Метаболизм метионина
BRCA1	Zn	Ремонт ДНК в ответ на повреждение ДНК
Grhl3	B8	Нейруляция, линия «закрученный хвост» («curly tail»)
Dbf4	Zn	Репликация ДНК во время размножения клеток
Dnmt3b	B9,Zn	Метилирование ДНК во время роста эмбриона
Fgfr1	B8	Рецептор факторов роста фибробластов
fog1	Zn	Дифференцировка мегакариоцитов
Gli3	Zn	Рост хондроцитов, формирование черепа и конечностей
Itga6	Ca	Интегрин, рецептор ламинина
Itgb1	Mg	Интегрин, рецептор коллагена
JMJ	B9	Эмбриональное развитие, в т. ч. сердца, печени и нервной трубки
Mac3	Ca, B8	Передача сигнала от рецепторов факторов роста через протеинкиназу C, регуляция актина
Mlp	Ca	Движение клетки за счёт актинового цитоскелета
Pfn1	B8	Поддержка структуры цитоскелета
Rara	A	Рецептор ретиноевой кислоты, необходим для роста клеток
Tcfap2a	A	Развитие нервной трубки, глаз, лица
Trp53	Zn	Регулировка роста/апоптоза клеток
PIP5K1C	B8	Передача сигнала от рецепторов факторов роста
IP3R1	B8	Передача сигнала от рецепторов факторов роста
Itpk1	B8	Передача сигнала от рецепторов факторов роста

Воздействие миоинозитола (витамин B8) на процессы роста эмбриона неразрывно связано с активностью сигнального белка *протеинкиназы C*, которая поддерживает передачу сигнала от белковых ростовых факторов, гормонов и нейротрансмиттеров (простагландинов, адреналина, ацетилхолина, серотонина, ангиотензина и др.), регулирует вазодилатацию и гликолиз, и принципиально важна для процессов роста эмбриона. В эксперименте, проведённом во время нейруляции, было установлено, что противодействие миоинозитола формированию ДНТ связано с активностью РКС-бета1 и РКС-гамма [24].

Из перечисленных в табл. 1 генов/белков, рассмотрим несколько примеров. В частности, фермент *инозитол 1,3,4-трифосфат 5/6-киназа* (ген *Itpk1*) является ключевым регуляторным ферментом синтеза сигнальной молекулы инозитол гексакисфосфата (IP6) - внутриклеточной сигнальной молекулы, участвующей в регуляции ионных каналов,

транспорте нутриентов и строительных материалов через клеточную мембрану (эндоцитоз, экзоцитоз), транскрипции и репарации ДНК [25]. Животные с делецией/инактивацией гена жизнеспособны, фертильны, но их эмбрионы часто обнаруживали ДНТ, осевые дефекты скелета, замедление роста и повышенную гибель нейронов (Рис. 13). Таким образом, миоинозитол-зависимый фермент *Itpk1* необходим для адекватного развития нервной трубки и профилактики ДНТ (Рис. 14) [26].

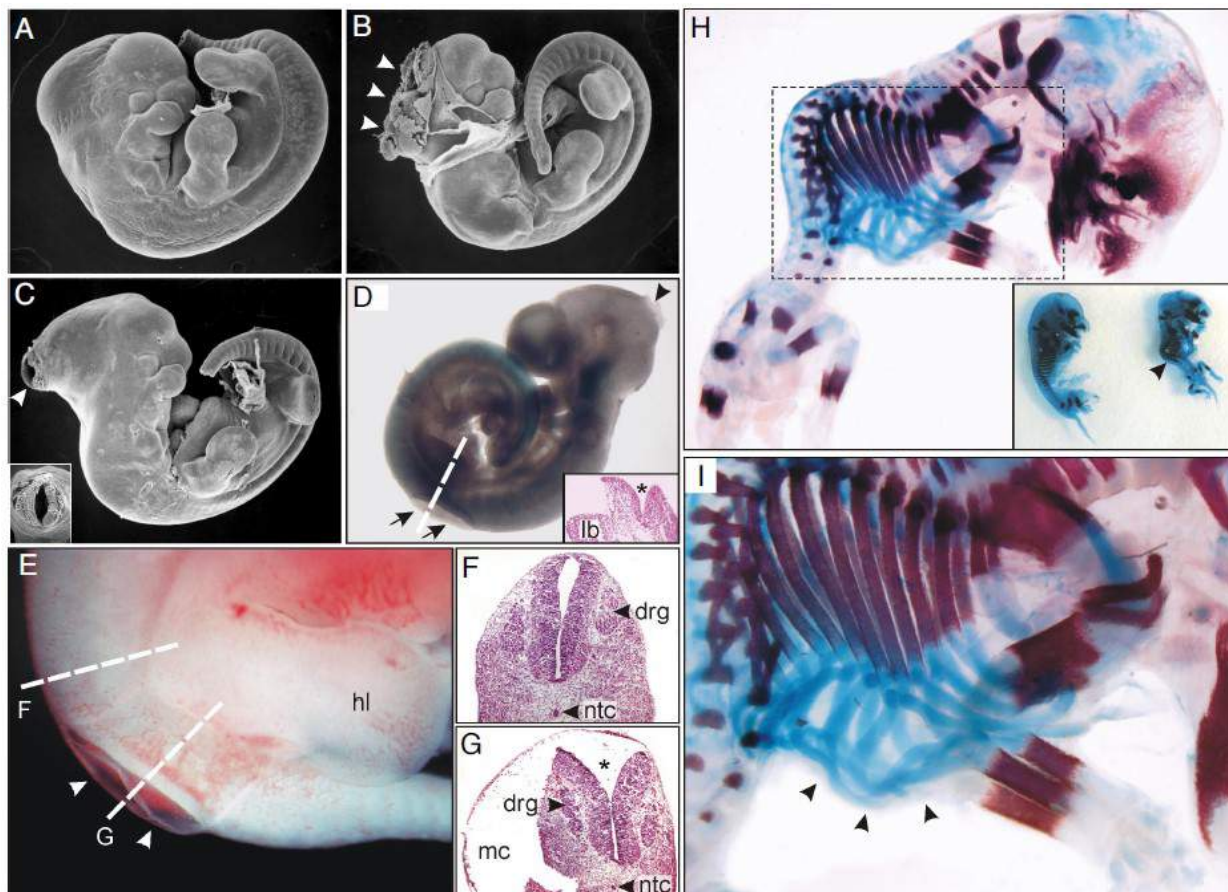


Рис. 13. ДНТ и осевые пороки развития скелета в эмбрионах, гомозиготных по инактивации гена *Itpk1* (инозитол 1,3,4-трифосфат 5/6-киназа, данные [26]). (А-С) Сканирующие электронные микрофотографии эмбрионов на 11-е сутки (E11.5). А – нормальный эмбрион, (В, С) 2 представителя того же помёта с различной степенью экзенцефалии (стрелки). Вставка на панели С – открытая нервная трубка. (D) Xgal-окраска мест экспрессии дефектного гена *Itpk1* у эмбриона с экзэнцефалией (стрелка) и расщеплением позвоночника (стрелки). Пунктирная линия указывает на ориентацию среза ткани, показанной на вставке, звездочка на вставке указывает открытый конец нервной трубки. (Е-Г) Образующаяся миеломенингоцеле (Е, стрелки) в эмбрионе E11.5. (F, G) Пунктирные линии указывали на ориентацию срезов ткани через неповреждённую часть нервной трубки (F) и открытую часть нервной трубки (G, звездочка). (H, I) Скелеты эмбрионов E14.5, окрашенные альциановым синим и ализарином красным для визуализации хряща и кости, соответственно. Вставка на панели показывает другие эмбрионы помёта, один из которых имеет кифосколиоз (стрелка). Обратите внимание на наличие неправильного сформированного ребра (наконечники стрел в I). **Обозначения:** drg, ганглии задних корешков; hl, задние конечности; lb, зачатки конечностей; mc, миелоцеле; ntc, хорда.

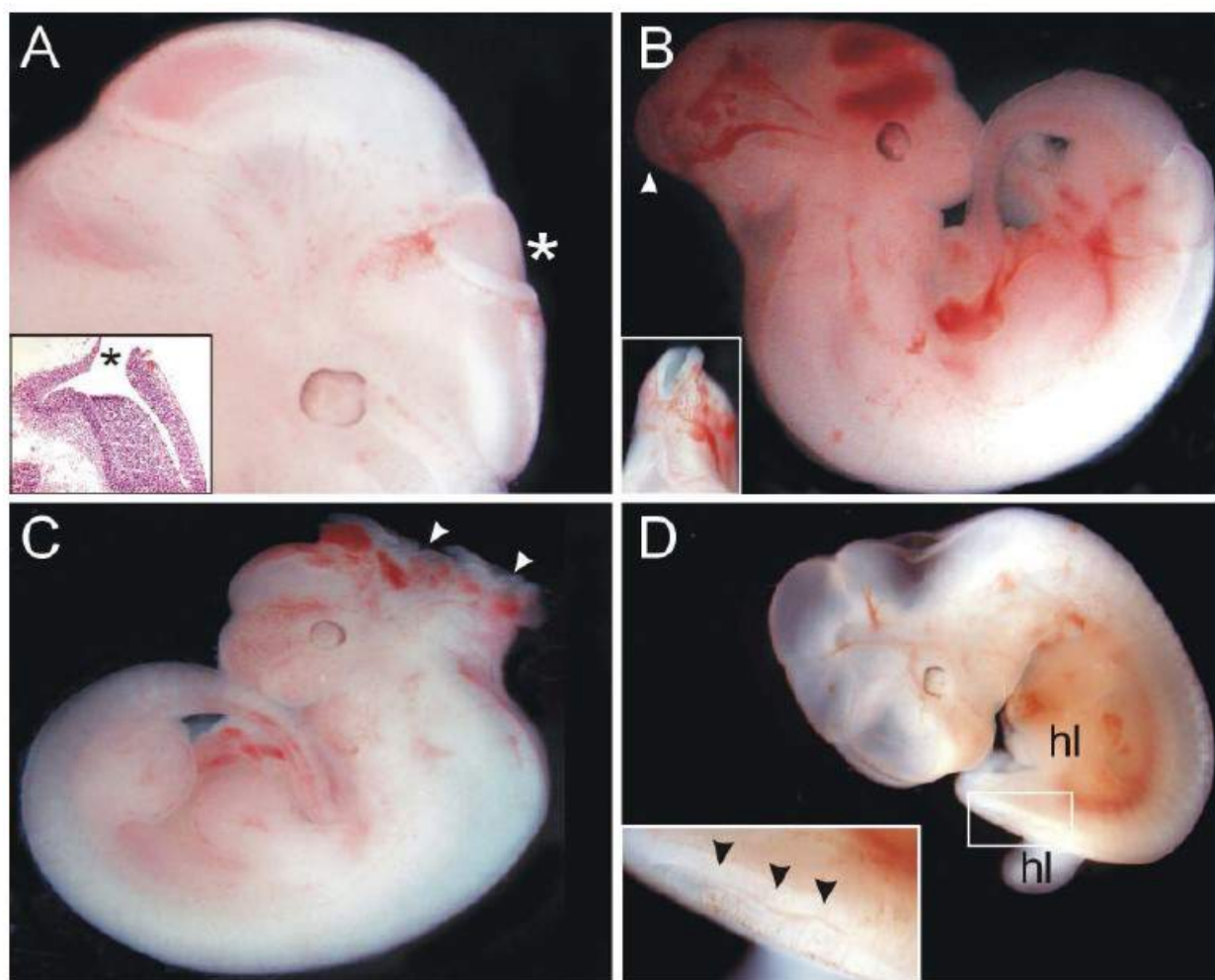


Рис. 14. ДНТ при делециях гена *Itpk1* (данные [25]). (А) Экзэнцефалия эмбриона, 12-е сутки (E12.5). На вставке показана окраска эозином разреза открытой нервной трубки («*»). (В) Экзэнцефалия, 12-е сутки. На вставке показан дорсальный вид на открытую нервную трубку (стрелка). (С) Тяжёлая экзэнцефалия, 11-е сутки. (D) Расщеплённые задние конечности (hl) в сочетании с хвостовым ДНТ, 12-е сутки. Показана открытая и искривленная нервная трубка (стрелки).

Фермент *фосфатидилинозитол-4-фосфат 5-киназа* (PIP5K, ген PIP5K1C) катализирует синтез одной из основных внутриклеточных сигнальных молекул – фосфатидил инозитол дифосфата (PIP2). Изоформа фермента PIP5K-гамма необходима для развития сердечно-сосудистой и центральной нервной систем. Целенаправленная инактивация гамма-изофермента PIP5K в эксперименте вызывала многочисленные нарушения роста клеток и развития тканей, в т. ч. приводящие к сердечной недостаточности (Рис. 15), усилению гибели нейронов, и дефектам нервной трубки (Рис. 16) [27].

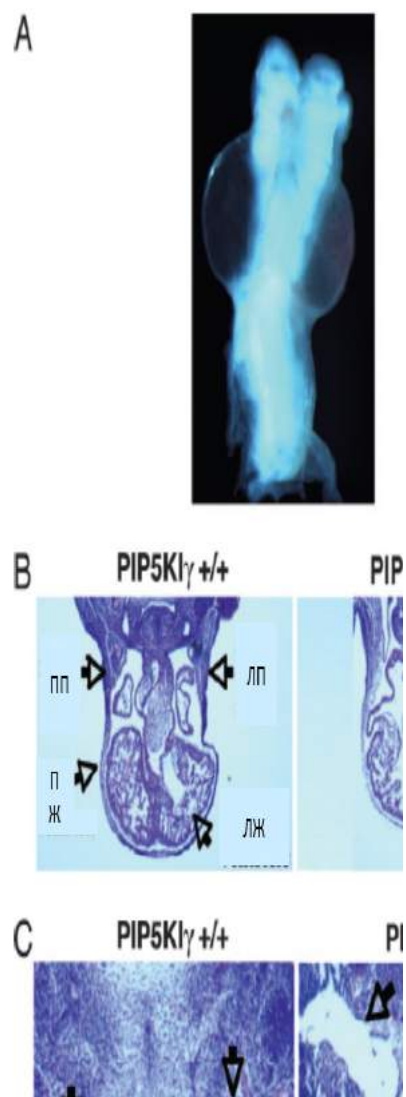


Рис. 15. Делеция гена $PIP5K1C$ приводит к выраженным сердечно-сосудистым дефектам эмбрионов (данные [27]) – перикардиту (А, вид спереди), единственному желудочку (В), увеличенным кардинальным венам (С, стрелки).

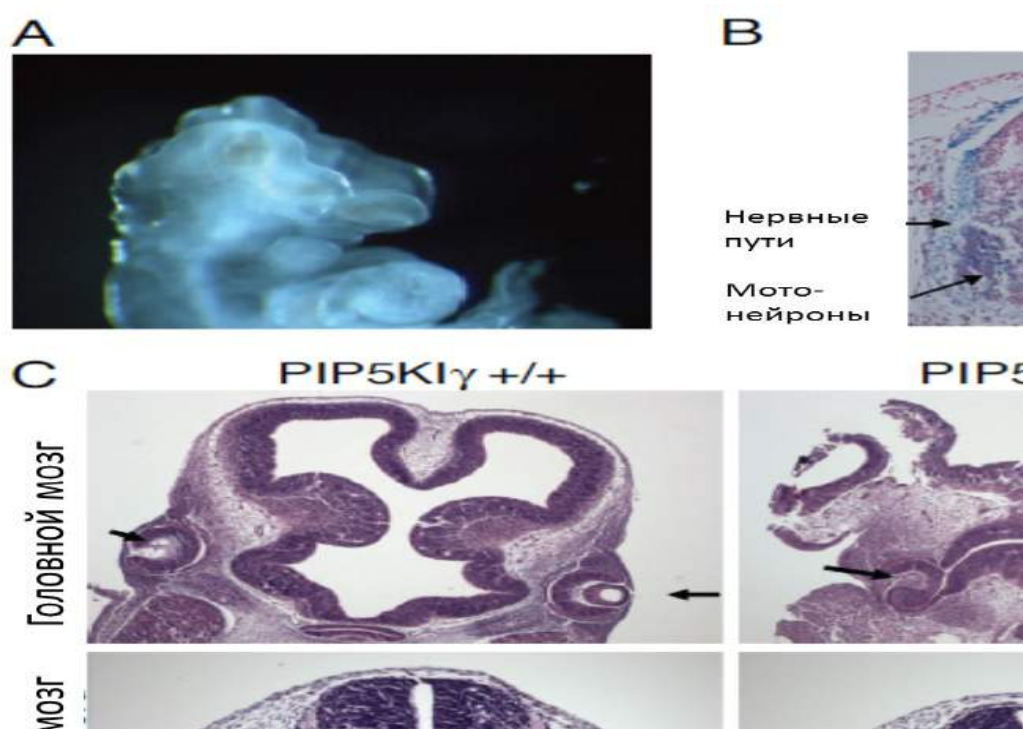


Рис. 16. Нейрональные дефекты при делециях гена *PIP5K1C* в эксперименте (данные [27])
 Примечания: (А) У *PIP5K*-нулевых эмбрионов нейроэпителий не может закрыться. (В) Распределение экспрессии гена *PIP5K1C* по спинному мозгу эмбриона. Окрашивание показывает, что *PIP5K1C* наиболее экспрессирован в моторных нейронах и развивающиеся восходящих и нисходящих нервных путей спинного мозга. (С) Сечения конечного мозга (вверху) и промежуточного мозга (внизу) эмбрионов E10.5 на уровне глаз (стрелки). Контрольный эмбриона отображает нормальное развитие (слева). Делеция *PIP5K1C* (справа) приводит к незакрыванию нервной трубки и аномально структурированному нейроэпителию. Хотя при делеции *PIP5K1C* спинномозговой «шнур» имеет нормальную общую морфологию, он уменьшен по дорсовентральной оси и медиолатеральной толщине. Масштабная метка – 25 микрон.

Заключение

Ишемические повреждения ЦНС плода – основная причина многочисленных заболеваний нервной системы у новорождённых. На ранних сроках беременности хроническая ишемия ЦНС приводит к порокам развития мозга. Хроническая ишемия мозга плода на более поздних сроках ассоциирована с высоким риском асфиксии в родах, дискоординацией родовой деятельности; повышается риск пост-гипоксической энцефалопатии, т. н. «минимальной мозговой дисфункции» и детского церебрального паралича. Хроническая ишемия мозга плода усугубляется на фоне инсулинрезистентности и глюкозотолератности.

Миоинозитол необходим для синтеза инозитолфосфатов и фосфатидилинозитоловых липидов, которые опосредуют передачу сигнала от рецепторов ростовых факторов и нейротрансмиттеров внутрь клетки. Эти производные миоинозитола крайне важны для развивающегося мозга, т. к. обеспечивают адекватную коммуникацию между нейронами, снижают хроническую ишемию нейронов и противодействуют глюкозотолератности.

Представленные в работе результаты указывают на выраженный нейропротекторный эффект миоинозитола на рост нейронов в культуре в условиях глутаматного стресса (повышение выживаемости нейронов, в среднем, на +17%). Прямое нейропротекторное действие миоинозитола указывает на важность использования миоинозитола как для профилактики пороков развития, возникающих на ранних сроках

беременности, так и для нейропротекции мозга плода на поздних сроках беременности. Подчеркнём, что в дотациях миоинозитола особенно нуждаются беременные с диетой, перегруженной углеводами, женщины с диабетом (в т. ч. гестационным), женщины, ранее родившие ребёнка с тем или иным пороком развития.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 18-07-00929, 17-07-01419, 16-07-01133, эксперименты на культивированных зернистых нейронах мозжечка крыс выполнены по плановой теме ФГБНУ «Научный центр неврологии».

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Громова Ольга Алексеевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: unesco.gromova@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-7663-710X

SPIN-код: 6317-9833

д. м. н., профессор, в. н. с., Институт фармакоинформатики, ФИЦ ИУ РАН, Москва

Gromova Olga

Corresponding author

e-mail: unesco.gromova@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-7663-710X

SPIN-код: 6317-9833

DM, professor, Institute of pharmacoinformatics FRC CSC RAS, Moscow

Калачева Алла Геннадьевна

ORCID ID: 0000-0001-6144-5781

SPIN-код: 4917-2391

к. м. н., доцент, доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России

Kalacheva Alla

ORCID ID: 0000-0001-6144-5781

SPIN-код: 4917-2391

assistant professor, Department of pharmacology FSBEI HE IvSMA MOH Russia

Торшин Иван Юрьевич

ORCID iD 0000-0002-2659-7998,

SPIN-код: 1375-1114

к. х. н., с. н. с., ФИЦ ИУ РАН, Москва; с. н. с., МГУ, Москва

Torshin Ivan

ORCID iD 0000-0002-2659-7998,

SPIN code: 1375-1114

Candidate of Chemical Sciences, Senior researcher in of Institute of Pharmacoinformatics at the Department of Intellectual Systems FRC CSC RAS, Moscow; Senior Research Officer MSU, Moscow

Стельмашук Е.В.

ORCID ID:

SPIN-код: 7884-9625

д.б.н. ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной нейробиологии отдела исследований мозга ФГБУ «Научный Центр Неврологии» Минобрнауки России

Stelmashuk E.V.

ORCID ID:

SPIN code: 7884-9625

Ph.D., MBA, leading researcher Research Center of Neurology laboratory of experimental neurocytology Brain Research Department Moscow Russia

Генрикс Е.Е.

SPIN-код: 8722-6305

к.б.н. научный сотрудник лаборатории экспериментальной нейробиологии отдела исследований мозга ФГБУ «Научный Центр Неврологии» Минобрнауки России

Genrikhs E.E.

SPIN-код: 8722-6305

Ph.D., Senior researcher, Research Center of Neurology laboratory of experimental neurocytology Brain Research Department Moscow Russia

Александрова О.П.

SPIN-код: 2705-7186

к.б.н. научный сотрудник лаборатории экспериментальной нейробиологии отдела исследований мозга ФГБУ «Научный Центр Неврологии» Минобрнауки России

Alexandrova O.P.

SPIN code: 2705-7186

Ph.D, researcher, Research Center of Neurology Brain Research Department laboratory of experimental neurocytology Moscow Russia

Хаспеков Л.Г.

ORCID ID: 0000-0002-6652-9412

Khaspekov L.G.

ORCID ID: 0000-0002-6652-9412

Литература / References

1. Здравоохранение в России. 2017: Стат.сб./Росстат. ISBN 978-5-89476-448-1, М., 2017, 170 с
2. Лиманова О.А., Громова О.А., Торшин И.Ю., и др. Систематический анализ молекулярно-физиологических эффектов мио-инозитола: данные молекулярной биологии, экспериментальной и клинической медицины // *Эффективная фармакотерапия*. –2013;28 с. 32-41. [Limanova OA, Gromova OA, Torshin IYu, et al. Systematic analysis of molecular mechanisms and physiological effects of myo-inositol: findings of molecular biology, experimental and clinical medicine. *Effektivnaya farmakoterapiya*. 2013;28:32-41. (In Russ).]
3. Larner J. D-chiro-inositol-its functional role in insulin action and its deficit in insulin resistance. *Int J Exp Diabetes Res*. 2002;3(1):47-60.
4. Rapiejko PJ, Northup JK, Evans T, et al. G-proteins of fat-cells. Role in hormonal regulation of intracellular inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biochem J*. 1986;240(1):35-40.
5. Fu C, Xu J, Cheng W, et al. Neuronal migration is mediated by inositol hexakisphosphate kinase 1 via α -actinin and focal adhesion kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Feb 21;114(8):2036-2041. DOI: 10.1073/pnas.1700165114.
6. Walecki J, Barcikowska M, Cwikla JB, Gabryelewicz T. N-acetylaspartate, choline, myoinositol, glutamine and glutamate (glx) concentration changes in proton MR spectroscopy (1H MRS) in patients with mild cognitive impairment (MCI). *Med Sci Monit*. 2011;17(12):MT105-MT111.
7. Coupland NJ, Ogilvie CJ, Hegadoren KM, et al. Decreased prefrontal Myo-inositol in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. 2005;57(12):1526-34. DOI: 10.1016/j.biopsych.2005.02.027.
8. Holub BJ. Metabolism and function of myo-inositol and inositol phospholipids. *Annu Rev Nutr*. 1986;6:563-97.
9. Андреева Н.А., Стельмашук Е.В., Исаев Н.К., и др. Нейропротекторные эффекты ноотропного дипептида ГВС-111 при кислородно-глюкозной депривации, глутаматной токсичности и оксидативном стрессе in vitro // *Бюлл. эксперим. биол. мед.* –2000. –Т130(10). С.418-421. [Andreeva NA, Stel'mashuk EV, Isaev NK, et al. Neiroprotektornye ehffekty nootropnogo dipeptida GVS-111 pri kislorodno-glyukoznoj deprivacii, glutamatnoj toksichnosti i oksidativnom stresse in vitro/ *Byull. ehksperim. biol. med.* 2000;130(10):418-421 (In Russ).]
10. Стельмашук Е.В., Новикова С.В., Исаев Н.К. Влияние глутамина на гибель культивированных зернистых нейронов, индуцированную глюкозной депривацией и химической гипоксией // *Биохимия*. –2010. –Т. 75(8). С.1150-1156. [Stel'mashuk EV, Novikova SV, Isaev NK. Vliyanie glutamina na gibel' kul'tivirovannyh zernistykh nejronov, inducirovannuyu glyukoznoj deprivaciej i himicheskoy gipoksiej. *Biochemistry*. 2010; 75(8):1150-1156. (In Russ).]
11. Громова О.А., Торшин И.Ю., Гоголева И.В., и др. Фармакокинетический и фармакодинамический синергизм между нейропептидами и литием в реализации нейротрофического и нейропротективного действия церебролизина // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова*. –2015. –Т. 115(3). С. 65-72. [Gromova OA, Torshin IYu, Gogoleva IV, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic synergism between neuropeptides and lithium in the neurotrophic and neuroprotective action of cerebrolysin. *Zhurnal neurologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2015;115(3):65-72. (In Russ).] DOI: 10.17116/jnevro20151153165-72
12. Guo MF, Yu JZ, Ma CG. Mechanisms related to neuron injury and death in cerebral hypoxic ischaemia. *Folia Neuropathol*. 2011;49(2):78-87.
13. Ганнушкина И.В., Шафранова В.П., Рясина Т.В. *Функциональная ангиоархитектоника головного мозга / АМН СССР* –М.: Медицина. –1977. –240 с. [Gannushkina IV, Shafranov VP, Ryasina TV. *Funkcional'naya angioarhitektonika golovnogo mozga / AMN SSSR* Moscow: Medicina. 1977:240. (In Russ).]
14. Hernandez-Fonseca K, Cardenas-Rodriguez N, Pedraza-Chaverri J, Massieu L. Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res*. 2008;86(8):1768-1780.
15. Громова О.А., Торшин И.Ю. Мультимодальный эффект церебролизина против воинствующего редукционизма. *Неврологический вестник*. –2008. –3. –С.83-91. [Gromova OA, Torshin IYu. Multimodal effect of Cerebrolysin versus aggressing reductionism. *Nevrologicheskii vestnik*. 2008;3:83-91. (In Russ).]
16. Cavalli P, Tonni G, Grosso E, Poggiani C. Effects of inositol supplementation in a cohort of mothers at risk of producing an NTD pregnancy. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2011 Nov;91(11):962-5. doi: 10.1002/bdra.22853. Epub 2011 Sep 28.
17. Cavalli P, Tedoldi S, Riboli B. Inositol supplementation in pregnancies at risk of apparently folate-resistant NTDs. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2008;82(7):540-2.

18. Beemster P, Groenen P, Steegers-Theunissen R. Involvement of inositol in reproduction. *Nutr Rev.* 2002;60(3):80-87.
19. Eriksson UJ, Wentzel P. Diabetic embryopathy. *Methods Mol Biol.* 2012;889:425-36.
20. Akashi M, Akazawa S, Akazawa M, et al. Effects of insulin and myo-inositol on embryo growth and development during early organogenesis in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes.* 1991 Dec;40(12):1574-9.
21. Khandelwal M, Reece EA, Wu YK, Borenstein M. Dietary myo-inositol therapy in hyperglycemia-induced embryopathy. *Teratology.* 1998 Feb;57(2):79-84. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9926(199802)57:2<79::AID-TERA6>3.0.CO;2-1.
22. Copp AJ, Greene ND. Neural tube defects: Prevention by folic acid and other vitamins. *The Indian Journal of Pediatrics.* 2000;67(12):915-921.
23. Juriloff DM, Harris MJ. Mouse models for neural tube closure defects. *Hum Mol Genet.* 2000 Apr 12;9(6):993-1000.
24. Cogram P, Hynes A, Dunlevy LPE, et al. Specific isoforms of protein kinase C are essential for prevention of folate-resistant neural tube defects by inositol. *Hum Mol Genet.* 2004;13(1):7-14.
25. Majerus PW, Wilson DB, Zhang C, et al. Expression of inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase (ITPK1) and its role in neural tube defects. *Adv Enzyme Regul.* 2010;50(1):365-72.
26. Wilson MP, Hugge C, Bielinska M, et al. Neural tube defects in mice with reduced levels of inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(24):9831-5.
27. Wang Y, Lian L, Golden JA, et al. PIP5KI gamma is required for cardiovascular and neuronal development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(28):11748-53.
28. Carlomagno G, Unfer V. Inositol safety: clinical evidences. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2011 Aug;15(8):931-936.